

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Biologie



Marek Schuma

Zvířecí modely intrauterinních infekcí
Animal models of intrauterine infections

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vedoucí práce: MUDr. Alla Šplíchalová, Ph.D.

Praha, 2012

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „Zvířecí modely intrauterinních infekcí“ vypracoval samostatně a že jsem uvedl veškerou použitou literaturu a informační zdroje. Tato práce, ani její podstatná část, nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 11. 5. 2012

Podpis:

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych chtěl poděkovat svému školiteli MUDr. Alle Šplíchalové, Ph.D. z Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i. za veškerou pomoc, kterou mi poskytla, trpělivost a čas, který mi věnovala. Děkuji také Ing. Bc. Igoru Šplíchalovi, CSc. za podnětné diskuze a cenné rady při vypracování bakalářské práce.

Obsah

Abstrakt	5
Seznam použitých zkratk	6
1. Úvod.....	7
2. Intrauterinní infekce	8
2.1. INTRAUTERINNÍ INFEKCE A PŘEDČASNÝ POROD	8
2.2. TRANSPLACENTÁRNĚ PŘENÁŠENÁ ONEMOCNĚNÍ	9
2.3. VSTUP INFEKCE.....	9
2.4. TYPY PLACENTACE.....	11
3. Zvířecí modely intrauterinních infekcí.....	14
3.1. POROVNÁNÍ ZVÍŘECÍCH MODELŮ.....	14
3.2. ZPŮSOBY APLIKACE PATOGENŮ	19
3.2.1. Intraamniální aplikace	20
3.2.2. Intrauterinní aplikace.....	20
3.2.3. Intracervikální aplikace	20
4. Zánětlivá odpověď a multiorgánová poškození	22
4.1. TOLL-LIKE RECEPTORY	23
4.2. CYTOKINY	24
4.3. MATRIXOVÉ METALOPROTEINÁZY	25
4.4. MULTIORGÁNOVÁ POŠKOZENÍ	26
5. Studie na zvířecích modelech.....	29
5.1. MYŠ	29
5.2. OVCE.....	30
5.3. PRIMÁTI.....	31
5.4. PRASE.....	31
6. Závěr.....	33
7. Použitá literatura	35

Abstrakt

Embryonální a fetální vývoj u savců probíhá ve sterilních podmínkách dělohy matky. Embryo a později plod jsou spojeny s placentou pupečnickem a vznášejí se v amniotické tekutině v amniotické dutině ohraničené amniotickou membránou. Předčasný porod je spojen se sníženou hmotností novorozenců a jejich zvýšenou nemocností a úmrtností. Intrauterinní infekce představují jednu z hlavních příčin předčasného porodu. Původci těchto infekcí jsou různá etiologická agens – viry, bakterie, plísně a prvoci. Tyto infekce vyvolávají expresi zánětlivých mediátorů, které se podílejí na spuštění předčasného porodu. Mezi tyto mediátory patří cytokiny.

Základem bakalářská práce je literární rešerše pojednávající o zvířecích modelech prenatálních infekcí, které jsou používány pro studium regulačních mechanismů předčasných porodů, případně pro studium možného ovlivnění těchto mechanismů. Jsou srovnána různá infekční agens a jejich části jako např. LPS a způsoby aplikace. Dále jsou diskutovány výhody a nevýhody různých zvířecích modelů s ohledem na typ placentace, průběh březosti, velikost zvířete a velikost vrhu. Práce obsahuje část pojednávající o zkušenostech s prasečím modelem intrauterinních infekcí v Mikrobiologickém ústavu AV ČR v Novém Hrádku.

Klíčová slova: intrauterinní, intraamniální, infekce, zánět, zvířecí, modely, plod, předčasný, porod, cytokiny

Abstract

In mammals, embryonic and fetal development takes place in the mother's uterus under sterile conditions. The embryo, and later the fetus, is connected to the placenta by the umbilical cord and floats in amniotic fluid in the amniotic cavity lined by the amniotic membrane. Preterm birth is associated with decreased weight of newborns and increased morbidity and mortality. Intrauterine infections are one of the leading causes of preterm delivery. Various etiological agents, such as viruses, bacteria, yeasts and protozoa, can cause these infections. These infections induce expression of inflammatory mediators, which participate in triggering of preterm birth. One of these mediators are cytokines.

The bachelor thesis is based on a literature review dealing with animal models of prenatal infections, which are exploited in the study of regulatory mechanisms of preterm births or eventually in the study of experimental manipulation of these mechanisms. Various infectious agents and their parts, such as LPS, and the routes of administration are compared. In addition, the advantages and disadvantages of different animal models are discussed with respect to the type of placentation, duration of gestation, animal weight and litter size. The thesis contains the section dealing with experience with a pig model of intrauterine infections in the Institute of Microbiology of the ASCR, v.v.i. in Nový Hrádek.

Keywords: intrauterine, intraamniotic, infection, inflammation, animal, models, fetus, preterm, birth, cytokines

Seznam použitých zkratek

ACTH	Adrenocorticotropic hormone	Adrenokortikotropní hormon
BPD	Bronchopulmonary dysplasia	Bronchopulmonární dysplazie
ECM	Extracellular matrix	Extracelulární matrix
FIRS	Fetal inflammatory response syndrom	Syndrom fetální zánětlivé odpovědi
HIV	Human immunodeficiency virus	Virus lidské imunodeficiency
HSV	Herpes simplex virus	Herpes simplex virus
IAI	Intraamniotic infection	Intraamniální infekce
Ig	Immunoglobulin	Imunoglobulin
IL-1	Interleukin - 1	Interleukin - 1
LPS	Lipopolysaccharide	Lipopolysacharid
LTA	Lipotechoic acid	Lipoteichoová kyselina
MMPs	Matrix metalloproteinases	Matrixové metaloproteinázy
MOF	Multiorgan failure	Multiorgánové poškození
PAMPs	Pathogen associated molecular patterns	Molekulární znaky typické pro patogeny
PCR	Polymerase chain reaction	Polymerázová řetězová reakce
PGE2	Prostaglandin E2	Prostaglandin E2
PGs	Prostaglandins	Prostaglandiny
PROM	Preterm rupture of membranes	Předčasná ruptura membrán
PTB	Preterm birth	Předčasný porod
RDS	Respiratory distress syndrom	Syndrom dechové tísně
TIMPs	Tissue inhibitor of metalloproteinases	Tkáňové inhibitory metaloproteináz
TLRs	Toll-like receptors	Toll-like receptory
TNF	Tumor necrosis factor	Faktor nekrotizující nádory

1. ÚVOD

Předčasný porod (PTB, preterm birth) vede ke zvýšené nemocnosti a úmrtnosti novorozenců. Mezi hlavní příčiny předčasných porodů jsou řazeny intraamniální infekce a chorioamnionitida.

Intrauterinní infekce, tj. infekce uvnitř dělohy se mohou objevit mezi stěnou dělohy a plodovými obaly v tzv. choriodeciduálním prostoru, v plodových obalech, uvnitř placenty, v plodové vodě, v pupeční šnůře nebo v těle plodu. Infekce plodových obalů doložená histologickým nálezem nebo kultivací se nazývá chorioamnionitida, infekce pupeční šnůry funisitida a infekce plodové vody amnionitida. Infekce plodových obalů, chorionu a amnionu se často objevuje při předčasném porodu. Intraamniální infekce u matky probíhá mnohdy asymptomaticky. Oproti tomu je velmi významná imunitní odpověď plodu na invazivní patogeny. Ta může vyústit v syndrom fetální zánětlivé odpovědi (FIRS, fetal inflammatory response syndrom), kdy dojde ke zvýšení hladiny prozánětlivých cytokinů a spouští se kaskáda dějů vedoucí k předčasnému porodu.

Bakterie, které jsou nejčastějšími infekčními agens, obvykle vniknou do dělohy z urogenitálního traktu a zůstávají na děložní sliznici, nebo penetrují dále přes chorion a amnion až do plodové vody a plodu. Překvapivě jde většinou o organizmy o nízké virulenci, které se často vyskytují v lidském těle jako komenzálové. V posledních letech se však ukazuje, že intraamniální infekce jsou zodpovědné nejenom za předčasné porody, ale také za akutní a chronická multiorgánová onemocnění. V několika studiích bylo pozorováno narušení vývoj plic, patogeneze centrální nervové soustavy a negativní ovlivnění vývoje dalších orgánů.

Výzkum této problematiky pochopitelně nelze provádět na lidech. Proto jsou zvířecí modely infekcí indukovaného PTB nezastupitelnou součástí výzkumu. Díky nim se postupně daří identifikovat mechanismy spouštějící porod. Slouží také k modelování negativních vlivů zánětu a PTB na vývoj plodu, zejména respiračních a neurologických následků. Hlavními modely jsou myš, ovce a primáti. Každý z nich má své výhody, nevýhody a zvláštní charakteristiky. To vše ovlivňuje možnost vztažení výsledků k lidskému porodu a plodu. Přednosti některého modelu umožňují studovat jeden typ problému, další modelový druh zase vyhovuje jinému. Protože se infekce nebo zánět nebo obojí významně pojí s PTB, je kladeno velké úsilí na objasnění mechanismů, kterými zánětlivá odpověď vyvolává PTB. V této práci je obsažen přehled modelů a jejich vlastností spolu se stručným přehledem studia intrauterinních infekcí u modelů i klinicky pozorovaných případů.

2. INTRAUTERINNÍ INFEKCE

2.1. Intrauterinní infekce a předčasný porod

Porod před dokončeným 37. týdnem gestace je klasifikován jako předčasný. Jde o složitý multifaktoriální proces. Až 50 % událostí předčasného narození se doposud jeví jako idiopatické, tj. s nerozpoznanou vyvolávající příčinou (Muglia a Katz, 2010). Navzdory očekávání a zvýšené zdravotní péči se incidence předčasných porodů nesnížila, ba naopak v USA došlo k nárůstu přibližně o 20 % od roku 1990 (Heron *et al.*, 2010), což je značně alarmující vzhledem k závažným komplikacím vyskytujícím se u předčasně narozených dětí. Kromě zdravotních komplikací předčasně narozeného jedince jsou s PTB spojeny vysoké náklady v řádech miliard korun každý rok.

S rostoucím množstvím důkazů můžeme s jistotou tvrdit, že infekce či zánět významně koreluje s incidencí PTB. Jedinci předčasně narození, kteří byli během nitroděložního vývoje vystaveni vlivu histologicky prokázané chorioamnionitidy, tvoří rostoucí podíl novorozenců s kratší dobou těhotenství – až 80% při kratší době gestace než 28 týdnů (Lahra *et al.*, 2009) a okolo 65 % při gestaci trvající méně než 37 týdnů (Ustun *et al.*, 2001). Infekce tudíž dereguluje normální načasování porodu spuštěním mechanismů PTB a způsobuje přibližně 70% nemocnosti u novorozenců s dlouhodobými následky na funkčnost plic a mozku (Goldenberg *et al.*, 2008). Bakteriální invaze do děložní dutiny je považována za nejčastější příčinu infekce, přestože bakterie jsou nalezeny pouze v menšině případů. Velká podmnožina klinicky skrytých případů může být diagnostikována kultivací plodové vody nebo histologickým vyšetřením placenty. Dnes díky PCR je analýza daleko přesnější a také ukazuje častější přítomnost hlavně bakterií rodů *Mycoplasma* a *Ureaplasma* než bylo dříve detekováno běžnou kultivací amniové tekutiny (Markenson *et al.*, 1997).

Počet přeživších předčasně narozených sice roste díky pokrokům v novorozenecké péči a možná také díky prenatálnímu používání steroidů. Incidence PTB však dosahuje až 12 % ze všech těhotenství s regionálními rozdíly (Goldenberg *et al.*, 2008) a přibližně 3 miliony novorozenců se nedožije prvního roku života (Ahman *et al.*, 2007). Snahy předejít PTB za použití tokolytik (farmakologické látky potlačující kontrakce dělohy) nebo antibiotik neuspěly dle očekávání (Gyetvai *et al.*, 1999). Nedávné klinické testy prokázaly, že aplikace progestačních činidel může snížit incidenci opakovaných PTB, ačkoliv mechanismy působení této prevence nejsou plně objasněny (da Fonseca *et al.*, 2003).

2.2. Transplacentárně přenášená onemocnění

Plod zdaleka nedosahuje obranyschopnosti srovnatelné s mateřskou, jeho imunitní systém je značně nevyvinutý. Infekce dělohy a jejího obsahu může způsobit potrat, předčasný porod a vývojové poruchy s dlouhodobými následky. V přehledu níže jsou vyjmenováni někteří původci transplacentárně přenášených onemocnění.

VIRY	
• HIV	• HSV
• <i>Rubivirus</i>	• <i>Parvovirus B19</i>
• <i>Cytomegalovirus</i>	• <i>Varicella</i>

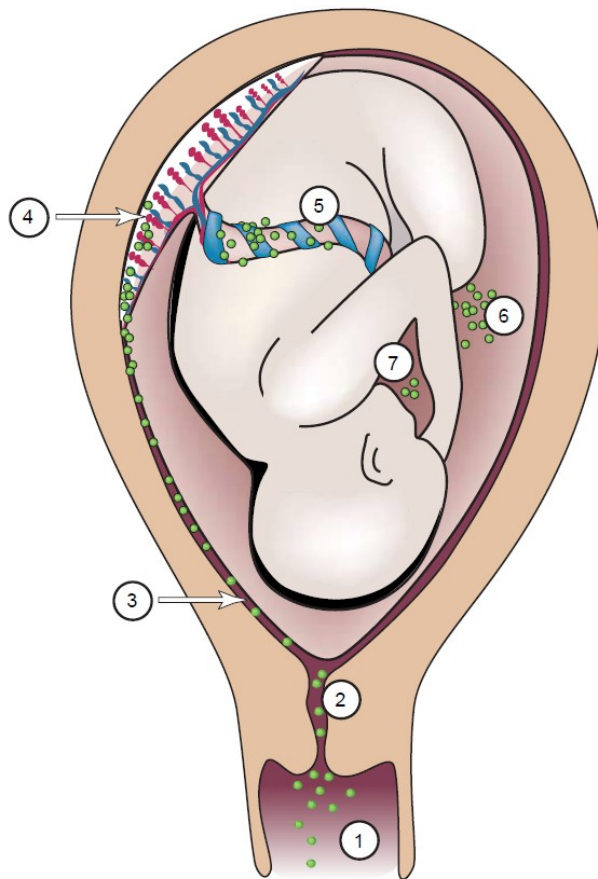
BAKTERIE	
• <i>Listeria monocytogenes</i>	• <i>Borellia burgdorferi</i>
• <i>Treponema pallidum</i>	• <i>Coxiella burnetti</i>
• <i>Mycobacterium leprae</i>	

PROTISTA	
• <i>Toxoplasma gondi</i>	
• <i>Trypanosoma</i> spp	
• <i>Plasmodium</i> spp	

Převzato a upraveno podle (Bittencourt a Garcia, 2002).

2.3. Vstup infekce

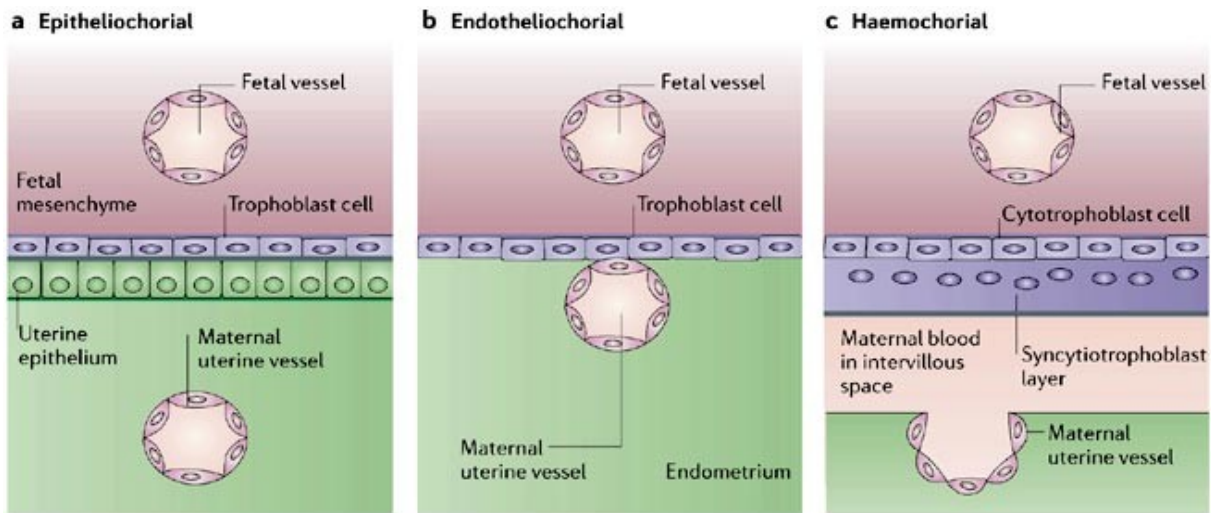
Bakterie mohou do dělohy pronikat z břišní dutiny skrze vejcovody, nebo jako kontaminace jehly při odběru plodové vody (Goldenberg *et al.*, 2000). Další cesta vstupu infekce je krví přes placentu. Ale nejčastější cesta infekce je pravděpodobně vzestupná, která vede z vagíny přes děložní krček (Gomez *et al.*, 1997), viz obr. 1. Mezi nejčastěji vyskytující se bakteriální infekce patří *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Gardnerella vaginalis* a další gram-pozitivní i negativní bakterie. Většinou se jedná o komenzální druhy s nízkou virulencí osidlující běžně genitální trakt, vzácně se objeví i organizmy rodu *Capnocytophaga*, které obvykle osidlují dutinu ústní (Ernest a Wasilauskas, 1985; cit. dle Goldenberg *et al.*, 2000).



Obr. 1: Vstup infekce přes děložní krček. 1, 2) Vzestup bakterií do choriodeciduálního prostoru (kvůli adhezenci nebo virulenci infekčního agens nebo imunologickému deficitu či genetické indispozici matky). 3) Replikace bakterií a vznik mateřské zánětlivé odpovědi. 4, 5) Invaze do placenty, dále pupeční šňůrou do plodu, nastává potenciální imunitní reakce plodu. 3) Možná je i penetrace skrze fetální membrány. Vzniká zánět při narušení obalu. 6) Bakterie volně v amniové dutině. 7) Plod může bakterie spolknout. Existuje alternativní hypotéza, že bakterie nedosáhnou amniové dutiny nebo plodu, ale zůstávají v choriodeciduálním prostoru a způsobí tam zánětlivou reakci, která postihne i placentu. Zánětlivé mediátory (cytokiny, chemokiny) se dostanou do fetální cirkulace a tam vyvolají imunitní reakci, tudíž analogie kroků 5-7, avšak místo bakterií tam figurují vlastní imunitní činitelé. Převzato a upraveno z (Elovitz and Mrinalini, 2004).

2.4. Typy placentace

Placenta je orgán, který hraje důležitou roli nejen při transportu kyslíku, živin a metabolitů, ale má i důležitý imunologický význam. Jednak je bariérou chránící plod před imunitním systémem matky, který by jej rozpoznal jako cizorodý, dále chrání před



Obr. 2: Typy placentace. Schematické zobrazení třech základních typů placentace znázorňuje kontakt mezi buňkami trofoblastu a krví matky. **A)** Epitheliochoriální typ. Buňky trofoblastu přiléhají k epitelu, ale nepronikají za tuto vrstvu. **B)** Endotheliochoriální typ. Děložní epitel je narušen a buňky trofoblastu jsou v přímém kontaktu s endotelem cév matky. **C)** Hemochoriální typ. Buňky trofoblastu působí rupturu mateřských cév, krev se vylévá do mezikllového prostoru. Syncytiotrofoblast je nepřetržitě omýván mateřskou krví. Převzato a modifikováno z (Moffett and Loke, 2006).

potenciálními patogeny v krevním oběhu matky a zároveň skrze ni u člověka prostupují důležité imunitní složky včetně imunoglobulinů. Není tomu však stejně u všech živočišných druhů – míra přenosu protilátek z matky na plod závisí na počtu vrstev, které tvoří placentární bariéru. Existuje několik typů placentace, viz obr. 1 a tab. 1. Šestivrstevná epitheliochoriální placenta u prasete brání přechodu buněk i makromolekul. Druhým pólem je hemochoriální placenta u člověka, která je permeabilní pro mateřské makromolekuly (např. IgG). Taktéž byl popsán oboustranný prostup buněk (Beer a Billingham, 1980; cit. dle Šterzl, 1993). U druhů, jejichž placenta neumožňuje přenos protilátek během těhotenství, je pasivní přenos imunitních látek zajištěn požitím a jejich vstřebáním z kolostra (Šterzl, 1993).

U hemochoriální placenty se tvoří choriové mikrokilky, které zasahují do endometria, čímž dochází k blízkému kontaktu embryonální a mateřské tkáně. Tento prostor se nazývá choriodeciduální. Spirální arterioly matky jsou invadovány trofoblasty. Povrch chorionu je omýván krví proudící z mateřského krevního oběhu. Přesto se u člověka transplacentárně přenáší z imunoglobulinů pouze IgG, ostatní Ig-izotypy nikoli. Počátek přenosu IgG u člověka je předpokládán různě, některé studie uvádí 16. týden gestace, jiné 20 týden, ve shodě jsou však v razantním nárůstu přenosu protilátek před koncem gestace (Saji *et al.*, 1999). Velmi předčasně narození jedinci nemají dostatek protilátek od matky, protože největší množství látek plod přijme po 34. týdnu gestace (Landor, 1995).

Zcela jinak tomu je u placenty epiteliochoriální, kde chorion má neinvazivní charakter, pouze přiléhá k povrchu endometria, které nevytváří deciduu. Buňky trofoblastu sice mohou být spojeny s povrchovým epitelem dělohy, ale nedochází k jejich proniknutí za tuto vrstvu (Moffett a Loke, 2006). Epiteliochoriální placentu tvoří celkem 6 vrstev: mateřský endotel, pojivová tkáň, epitel, trofoblast, pojivová tkáň a fetální endotel. Tato bariéra zabraňuje styku krevního oběhu matky a plodu, viz obr. 2. Kvůli tomu nemohou imunoglobuliny přestupovat do krevního oběhu plodu. Narození jedinci tedy nedisponují mateřskými protilátkami a přenos probíhá výhradně postnatálně kolostrem (přestup do oběhu – především IgG) a později jsou imunoglobuliny dodávány novorozenci mlékem (ochrana na sliznicích – IgA). Ig z kolostra jsou dále resorbovány enterocyty, které tvoří střevní epitel. Tento typ placenty mají prasata, koně, osli, lamy a někteří vačnatci. Podobné vlastnosti vykazuje syndesmochoriální placenta (skot, ovce).

Plod postupně dokáže již během svého nitroděložního vývoje projevit určitou imunitní odpověď na antigenní podnět. U prasečího plodu se objevují lymfatické buňky v thymu, játrech a periferní krvi ve 28. dni gestace (Tlaskalova-Hogenova *et al.*, 1994). U prasat byla dokonce pozorována produkce antigenně specifických protilátek v 55. dni gestace jako reakce na jejich nitroděložní imunizaci, lymfocyty vykazující aktivitu podobnou T a B-buňkám se poprvé vyskytly v šestém týdnu těhotenství (Tlaskalova-Hogenova *et al.*, 1994).

Uspořádání endoteliální placenty (kočka, pes, králík) spočívá v propojení děložního endotelu s choriálními klky. Buňky trofoblastu jsou mírně invazivní. Oběhy matky a plodu jsou odděleny čtyřmi buněčnými vrstvami, endotel cév matky, chorion, fetální mesenchym a fetální endotel. Transplacentárně se přenáší pouze 5-10% mateřských protilátek, zbytek předává matka v kolostru (Tizard, 2009).

Další skupinu tvoří myši a krysy, mají hemoendoteliochoriální placentu. Podobná struktura placenty se také vyskytuje u králíka, kde se protilátky dostávají do plodu přes entoderm žloutkového vaku. (Šterzl, 1993). Ostatní protilátky prostupují placentou nebo jsou v mateřském mléku.

Souhrnně tedy hemochoriální a endoteliální placenta umožňuje přenos protilátek, přestože existují různé limitující faktory. Oproti tomu epiteliochoriální a syndesmochoriální placenta je několikvrstevnou bariérou, která zabraňuje přenosu protilátek od matky k plodu. U těchto druhů je přenos imunitních složek zajištěn výhradně kolostrem, které musí být přijato do 48. hodin po porodu (Chucrí *et al.*, 2010).

Placenta *)		Hemo-choriální	Hemoendo-teliální	Endotelio-choriální	Syndesmo-choriální	Epitelio-chorální
Tkáň mateřská - decidua	Endotel	0	0	+	+	+
	Pojivová tkáň	0	0	0	+	+
	Epitel	0	0	0	0	+
Tkáň embryonální - chorion	Trofoblast	+	+	+	+	+
	Pojivová tkáň	+	+	+	+	+
	Endotel	+	+	+	+	+

Živočišný druh**)	Člověk Opice	Králík Morče	Myš Potkan	Pes Kočka	Skot Ovce	Kůň Prase
Prenatální přenos protilátek	+++ placentou	+++ žloutkový vak	+	+	0	0
Přenos kolostrem a mlékem	0	0	++	++	+++	+++
Vstřebávání Ig střevem (dny, hodiny)	0	0	10-20 d	0	24-36 h	24-36 h

Tab. 1: Vztah typu placenty k přenosu mateřský protilátek

*) 0 nebo + : přítomnost nebo nepřítomnost příslušné tkáně.

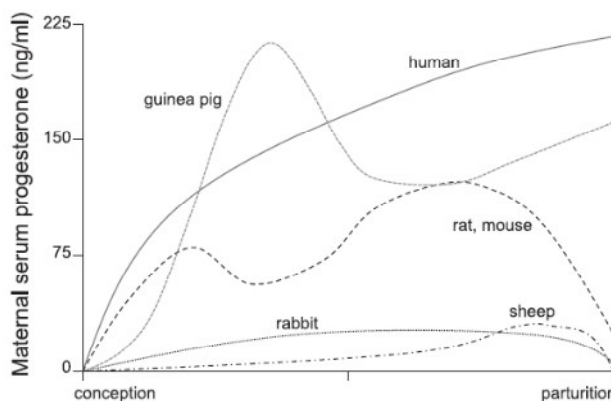
**) 0; +; ++; +++ : intenzita přenosu protilátek..

Převzato a upraveno z (Šterzl, 1993).

3. ZVÍŘECÍ MODELY INTRAUTERINNÍCH INFEKČÍ

Studium intrauterinních infekcí a PTB úzce souvisí se zvířecími modely, neboť z pochopitelných etických důvodů nelze pokusy provádět na člověku. Ačkoliv existuje několik modelových zvířecích druhů, díky kterým se daří postupně objasňovat průběh a mechanismy ukončení těhotenství respektive spuštění porodu, stále nejsou klíčové děje uspokojivě známy. Částečně je neporozumění způsobeno zásadními rozdíly v těchto mechanismech mezi modely navzájem a částečně odlišnostmi vůči lidskému organismu.

Příkladem může být druhově odlišná regulace produkce progesteronu, hlavního hormonu, který podporuje a udržuje těhotenství, viz obr. 3. Samozřejmě tímto a jinými kritérii je zúžen výběr vhodných modelových organismů pro ozřejnění mechanismů týkajících se lidského porodu. Přesto zvířecí modely představují nenahraditelný způsob, jakým lze identifikovat a studovat signální dráhy spjaté s PTB a případně k testování preventivních terapeutických zásahů.



Obr. 3: Pokles sérového progesteronu u matky se před porodem vyskytuje u většiny modelů. Převzato a upraveno z (Mitchell and Taggart, 2009).

3.1. Porovnání zvířecích modelů

Důležitými vlastnostmi zvířecích modelů pro infekcí indukovaného PTB jsou podobnost průběhu PTB člověka, shodná či rozdílná reprodukční biologie, náklady na chov, možnost použití většího počtu zvířat, imunitní odpověď na infekci a maturační specifika plodu. V ideálním případě by model vyhovoval všem uvedeným kritériím, nicméně tato situace nenastává, neboť žádný model není totožný s lidským organismem. Přesto jednotlivé modely poskytují velmi cenný vhled při studiu mechanismů porodních komplikací a dalších onemocnění. Musí být tedy uvažovány specifické vlastnosti, výhody a nevýhody zvířecích modelů a zároveň voleny odpovídající metody. Pokud se toto podaří, bude možné aplikovat výsledky a dosáhnout zavedení efektivní léčby a prevence PTB. Studie prováděné se

zvířecími modely již přinesly některé klíčové poznatky, které postupně vedou k objasnění mechanismů PTB a konečně k jejich možné regulaci. Dále jsou uvedeny různé zvířecí modely, současně používané ve studiích PTB a také hlavní výhody či nevýhody jednotlivých modelů, které jsou shrnuty v tab. 2.

I přes zřejmé odlišnosti od člověka představují hlodavci se svou reprodukční biologií vyhledávané modely. Patří mezi nízkonákladové modely s krátkou gestační dobou okolo 21. dnů. Poměrně rychle dosáhnou reprodukční zralosti. Možnost práce s vyšším počtem jedinců a nízké náklady přináší mnoho výhod, díky kterým jsou hlodavci poměrně často využíváni v experimentech. Myši navíc z genetického hlediska nabízejí nejvíce možností modifikací a jejich genom je nejlépe prostudován. Díky používání knock-outů a jiných mutantů lze určovat dráhy týkající se porodu. Tímto způsobem bylo dokázáno, že změny ve vybraných genech indukují defekty drah účastnících se porodu a některé dráhy se ukázaly jako zcela nepodstatné (Kimura *et al.*, 1999). Mimo to existuje více dostupných protilátek než pro jiné druhy.

Na druhou stranu myší model má i neopominutelné nevýhody. Krátká gestační doba v porovnání s člověkem je na překážku při studiu chronické infekce nebo testování farmaceutik. Při intraperitoneální aplikaci se u různých kmenů myši liší efektivita indukce PTB a matka je poměrně často nemocná nebo uhynie (Elovitz a Mrinalini, 2004). Největší komplikací je systémový pokles progesteronu potřebný pro spuštění porodu. Nedávno však byly publikovány studie, které ukazují, že úbytek progesteronu není nezbytný pro PTB u myši a dodáváním progesteronu se nezabrání PTB (Elovitz a Wang, 2004). Pro svou velikost a velikost vrhu nejsou vhodné k častým chirurgickým zákrokům. Dosud nebyly důkladně prozkoumány účinky systémově aplikovaných bakterií nebo jejich komponent na krevní tlak matky.

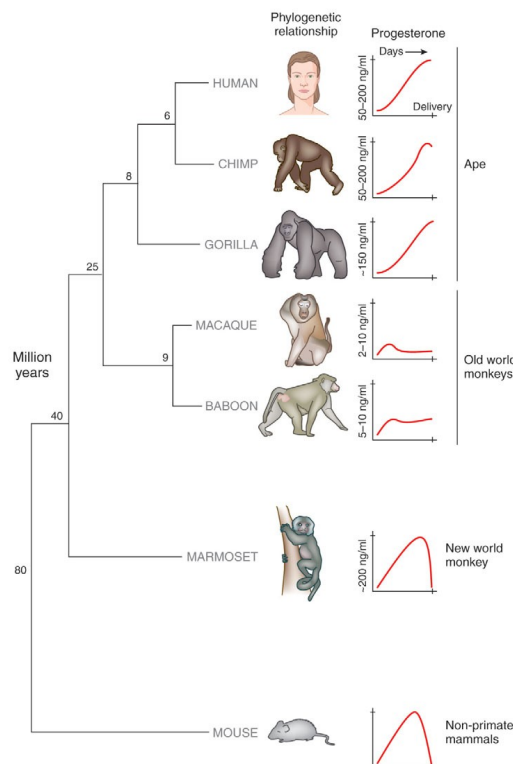
Ovce je tradičním modelem při studiu předčasného porodu. Gestační doba se pohybuje okolo 147 dní, což umožňuje dlouhodobé analýzy a testování léčiv. Chirurgické zákroky jsou proveditelné u matky i plodu a katetrizace slouží k získávání obsáhlých dat. Ovčí model je však náročnější na podmínky chovu. Potřebuje pastvu a specializovanou laboratoř. Toto vše vede k nárůstu nákladů. Další nevýhodou je pomalejší dosažení pohlavní dospělosti. Po fyziologické stránce, zejména porodu, je ovce dobře prostudována, nicméně po imunologické a genetické stránce zdaleka nedosahuje našich znalostí o hlodavcích, z čehož plyne i výrazně nižší nabídka protilátek a jiných reagensů pro metody na molekulární úrovni. U ovce fetální kortizol zapříčiňuje zvýšení syntézy placentárních enzymů, což působí opět snížení produkce progesteronu a kauzálním zvýšením syntézy estradiolu dochází k porodu. (Challis *et al.*, 2000).

U většiny modelů předchází systémové snížení progesteronu porodu. Avšak u člověka a primátů se zdá, že tento jev není nezbytný před spuštěním porodu. Primáti mají člověku velmi podobnou reprodukční biologii a jsou téměř dokonalým modelem, překážkou však zůstávají vysoké náklady a s tím spojený omezený počet jedinců. Obdobně jako u ovcí katetrizace zaručuje získávání množství dat a lze také nepřetržitě měřit aktivitu dělohy. Dalším faktorem je i etický faktor, kdy na organizmy člověku vývojově bližší je přece jenom nazíráno jinak než např. na hlodavce.

Prase představuje zajímavý model, protože se člověku podobá anatomicky, fyziologicky i geneticky. Je všežravec stejně jako člověk. Období březosti trvá relativně dlouho (114 dní), pohlavní dospělost nastává poměrně brzo (5.- 8. měsíc). Počet mláďat ve vrhu se pohybuje okolo deseti – podle prošlechtěnosti plemene.

Prasata navíc vydrží větší dávky infekčních agens než hlodavci. Jejich odolnost je činí v tomto ohledu užitečným modelem intrauterinní infekce. V některých ohledech je prase opravdu vhodnějším modelem než hlodavci. Vývoj vakcín se zaměřuje na prasečí model, který lépe splňuje podmínky pro vyvinutí vhodného terapeutického zásahu. Různá plemena se liší velikostí, často jsou používána miniaturní prasata. Dostatečná délka života, 10-20 let, poskytuje, v případě potřeby, čas k dlouhodobějšímu pozorování účinků léčiv a infekce. Po člověku a myši je imunitní systém prasat nejlépe charakterizován (Meurens *et al.*, 2012). Proběhly zajímavé pokusy, které úspěšně zacílily na transplantaci orgánů z prasete primátovi (Ibrahim *et al.*, 2006).

Genom prasete obsahuje poměrně hodně homologií s lidským genomem, stejně i proteiny jsou vysoce homologní. Po shrnutí všech výhod tohoto modelu a porovnání s primátem vyplývá, že prase je dobrý, levnější a eticky přijatelnější model pro uterinní infekce než primáti. Genetická variabilita napříč plemeny vybízí k porovnání projevů infekce u různých modelů stejného druhu. Možná tento model z etických příčin postupně vytlačí jiné velké zvířecí modely – opice a psy.



Obr. 4: Srovnání hladiny progesteronu během těhotenství.

Převzato z (Ratajczak *et al.*, 2010).

Pro úplnost je třeba zmínit i méně rozšířené modelové druhy, mezi které patří morče (Wang *et al.*, 2010) a skot (van Engelen *et al.*, 2009).

Specifickým problémem je progesteron a jeho působení. Průběh těhotenství člověka se zásadně odlišuje v nárůstu sérového progesteronu, proti tomu u většiny modelů dochází k úbytku progesteronu před porodem (Ratajczak *et al.*, 2010). Možné vysvětlení je, že u člověka se nejedná o systémový pokles, nýbrž o funkční pokles, který *de facto* způsobí stejný efekt, a sice iniciaci porodu (Mesiano *et al.*, 2002). Existují hypotézy, které se pokouší identifikovat mechanismy účastnící se tohoto funkčního poklesu. Pravděpodobně se na tom podílí více mechanismů samostatně nebo ve spolupráci. První hypotéza říká, že progesteronový receptor se mění v izoformu postrádající svou původní funkci, která je významně více exprimována v porovnání s funkční formou. Nefunkční forma váže sérový progesteron a utlumuje tím vazbu na funkční izoformu (Pieber *et al.*, 2001). Druhá hypotéza se týká intrauterinního metabolismu progesteronu, prostřednictvím kterého by byla lokální koncentrace progesteronu snižována, případně ještě se souběžnou produkcí biologicky aktivních metabolitů, které by také zabraňovaly působení progesteronu (Karteris *et al.*, 2006; Kemp *et al.*, 2010).

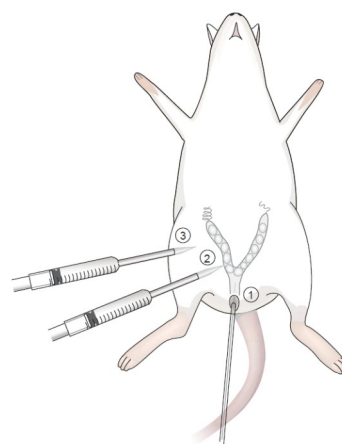
	Délka gesta- ce	Počet mláďat ve vrhu	Morfo- logie placenty	Děloha, dvou/ jedno- rohá	Zdroj progeste- ronů	Snížení hladiny progeste- ronů	Indukce předčasného porodu	Výhody	Nevýhody	Fetus
Potkan	22±1	10±5	Hemotri- choriální	Dvou- rohá	Corpus luteum	Ano	Antiprogestin, ovariectomie	Dobře snáší chirurgické zákroky, nízké náklady	Malá velikost, více rezistentní na zánětlivé stimuly	Myelinizace opožděná oproti člověku, multiparita
Myš	20±1	10±6	Hemotri- choriální	Dvou- rohá	Corpus luteum	Ano	Antiprogestin, ovariectomie, LPS	Dobře snáší chirurgické zákroky, nízké náklady, genetické modifikace	Malá velikost	Myelinizace opožděná oproti člověku, multiparita
Morče	67±3	3±2	Hemo- mono- choriální	Dvou- rohá	Corpus luteum, placenta	Částečně mezi 40. a 50. dnem, ne při porodu	Antiprogestin, prostaglandin, oxytocin	Podobná placenta lidské, bez úbytku progesteronu	Nepříliš osekvo- vaný genom	Možná multiparita
Králík	32±3	8±4	Hemodi- choriální	Dvou- rohá	Corpus luteum	Ano	Antiprogestin, ovariectomie	Proveditelná transcervikální administrace infekčního agens	Středně vysoké náklady	Multiparita
Ovce	147±4	1–2	Epitelio- choriální	Dvou- rohá	Corpus luteum, placenta	Ano	Fetální ACTH, glukokortikoidy antiprogestin	Možná stálá katetrizace, možnost měřit mateřské i fetální sérové hladiny, lze stanovit přímo kontraktilitu myometria, podobná děloha lidské	Vysoké náklady, omezené množství	Fetální hmotnost při porodu podobná lidskému novorozenci
Opice	167±7	1		Jedno- rohá	corpus luteum, placenta	Ne	Inokulace bakterií, LPS nebo cytokinů (IL-1β)		Nákladný, omezená dostupnost	
Člověk	280±14	1	Hemo- mono- choriální	Jedno- rohá	Corpus luteum placenta	Ne	Maturace děložního krčku (PGE2 nebo antiprogestin), oxytocin (hrdlo zkrácení)			
Prase	114	10–12	Epitelio- choriální	Dvou- rohá	Corpus luteum	Ano		Velikost, genom		Multiparita

Tab. 2: Zvířecí modely PTB a jejich charakteristika (Ratajczak et al., 2010; Mitchell and Taggart, 2009; Elovitz and Mrinalini, 2004). Modelové druhy mají výhody a nevýhody, které spočívají v podobnostech nebo odlišnostech od reprodukční biologie a imunity člověka. Dalším kritériem je dostupnost, možnost použití velkého počtu jedinců a s tím související náklady. Důležitá fakta k lidskému porodu: hlavní spouštěč není znám, gestační doba je přibližně 280 dní a systémový pokles progesteronu před porodem není pozorován. Plod by mohl hrát roli při signalizaci, ale chybí jasné důkazy. Na rozdíl od hlodavců, myelinizace u novorozence probíhá.

3.2. Způsoby aplikace patogenů

Snaha napodobit to, co se odehrává při PTB vyvolaném infekcí nebo zánětlivou reakcí zahrnuje použití různých etiologických agens jako jsou usmrcené nebo živé *E. coli*, streptokok typu B, složky buněčných stěn gram-negativních bakterií (LPS), gram-pozitivních bakterií (LTA), interleukin-1 (IL-1), faktor nekrotizující nádory α (TNF- α) a také netypické bakterie, např. *Ureaplasma urealyticum*. Pokud je modelována situace, kdy je infekce zjevná, nebo bakterie kolonizují amniovou tekutinu, používají se živé bakterie. V případech, kde infekce neprobíhá přímo zjevně, je vhodné použít cytokiny nebo komponenty buněčných stěn.

Možnost vytvoření přesné modelové situace se ještě rozšiřuje cestou aplikace daného agens. Existují modely buď systémové, nebo lokalizované infekce a zánětu. Systémový model infekce je docílen při intraperitoneální případně intravenózní aplikaci patogenu. Zčásti je tento způsob provázen s onemocněním nebo úmrtím matky. Infekce indukuje PTB různě podle místa aplikace a jednotlivé modely jsou různě citlivé. Myš bývá obvykle citlivější na intraperitoneální aplikaci než potkan, avšak u obou nastane PTB (Terrone *et al.*, 2001). Také dochází k potratu u myši při systémové aplikaci LPS (Kohmura *et al.*, 2000). Obvykle se však při PTB infekce nevyvine v systémové onemocnění, ani není pozorováno větší množství C-reaktivního proteinu, výskyt horečnatých stavů, nebo leukocytóza (Yoon *et al.*, 1996). Proto modely systémové infekce nemusí nejlépe vystihovat situaci, která nastává u většiny PTB. Modely lokální infekce by proto mohly přesněji napodobit klinicky pozorované případy. Mezi lokální způsoby aplikace řadíme intraamniální, intrauterinní a intracervikální. Intraamniálně se patogeny vpravují zejména u primátů a ovcí, neboť u hlodavců je tento způsob komplikovaný pro více plodových membrán a malou velikost plodu. Při intrauterinním podání je nutné zajistit anestezii a disponovat potřebnými chirurgickými dovednostmi. Intracervikální podání vyžaduje zase zkušenosti s endoskopií, protože jinak zejména u myši hrozí aplikace intraperitoneálně. Každý z těchto způsobů přináší výhody i nevýhody dále pojednané podrobněji.



Obr. 5: Aplikace infekčních agens.

- 1) Intracervikálně. 2) Intrauterinně.
- 3) Intraperitoneálně. Převzato a upraveno z (Elovitz and Mrinalini, 2004).

3.2.1. Intraamniální aplikace

Intraamniální aplikace se týká převážně ovcí a primátů, provedení u hlodavců je složité. V tomto modelu se počítá s průnikem bakterií do amniotické tekutiny a s tím, že nejenom mateřské imunitní mediátory, ale i fetální zánětlivá odpověď má podíl na spuštění PTB. Velikost těchto modelů umožňuje zavedení katetru do těla matky i plodu a proto může být stále měřena kontraktilita dělohy. Významný rozdíl existuje mezi změnou kontraktility u ovce a opice po podání LPS. Kontraktilita u ovce vzroste pouze mírně a nevede k PTB, naopak u opice vzroste významně a může dojít až k PTB (Gravett *et al.*, 1994; Grigsby *et al.*, 2003).

Ačkoliv u žen, které předčasně porodily, je obvykle amniotická tekutina negativní na přítomnost bakterií (Yoon *et al.*, 2001), často se objeví abnormálně vyšší koncentrace LPS koreceptoru (CD14), LPS vázajícího proteinu a cytokinů (IL-6, IL-1) (Baud *et al.*, 1999; Gardella *et al.*, 2001). Tyto mediátory nepřímo potvrzují přinejmenším probíhající zánětlivou reakci nebo potenciální infekci, kterou nelze detekovat běžnou kultivací.

Nespuštění PTB intraamniální aplikací LPS u ovce ji činí nezpůsobilým modelem pro studium vyvolání PTB aplikací LPS tímto způsobem.

3.2.2. Intrauterinní aplikace

Tato cesta je převážně používána u hlodavců. LPS se vpraví do děložního rohu, aniž by proniklo do plodových obalů. U myši je pozorována vysoká frekvence PTB a nízká až žádná nemocnost matky, po systémové aplikaci zabitých i živých bakterií nebo LPS (Elovitz *et al.*, 2003). Zdá se, že ke spolehlivé indukci PTB musí být dosaženo kritického množství bakterií, u potkana musí být opakovaně dodáváno nízké množství LPS (Romero *et al.*, 1991).

Intrauterinní aplikace LPS u potkanů způsobí vysokou míru potratů, podobně jako je tomu u systémového modelu (Elovitz a Mrinalini, 2004).

Tento model předpokládá vznik imunitní odpovědi nejprve v decidue a myometriu. Nevýhodou je nepřítomnost kolonizace bakteriemi ve vagíně a krčku spojená s nepřítomností imunitní odpovědi, která může být prvopříčinou PTB. Přesto intrauterinní aplikace prozatím docílí nejbližšího napodobení klinicky pozorované situace.

3.2.3. Intracervikální aplikace

Intracervikální aplikace byla poprvé vyzkoušena na myši (Reznikov *et al.*, 1999). Pro úspěšné provedení procedury musí zkušený operátor ovládat práci s endoskopem. Hrozí totiž

inokulace intraperitoneálně, což by navodilo systémovou imunitní odpověď. Elovitz a Mrinalini (2004) se ve své práci zmiňují o pokusu aplikovat vysokou dávku LPS do vagíny myši, který však neproběhl optimálně, výsledky totiž byly velmi proměnlivé. Je potřeba dalších pokusů na více modelech, přínos by mohl být v ještě přesnější simulaci klinicky pozorované situace než u intrauterinního modelu, protože zde se počítá s kolonizací vagíny jako s primární příčinou PTB.

4. ZÁNĚTLIVÁ ODPOVĚĎ A MULTIORGÁNOVÁ POŠKOZENÍ

Zánět je ochranný mechanismus zprostředkovaný složkami vrozené i adaptivní imunity. Zánětlivá reakce brání organismus proti mnohým narušením homeostázy od běžného poranění tkáně až po mikrobiální infekce. Jedná se o regulovaný proces, kterým tělo odpovídá na škodlivé stimuly s cílem zabránit většímu rozsahu poškození a šíření nákazy a který odstartuje regeneraci postihnutých tkání. Klinicky se projevuje zánět 5 projevy: otok, zarudnutí, bolest, zvýšení teploty a ztráta funkce. Hlavní signalizace probíhá přes cytokiny, chemokiny a další zánětlivé mediátory.

Nepřiměřená nebo neadekvátní zánětlivá odpověď sama zodpovídá za onemocnění a úmrtí u dospělců. V případech s invazí mnohdy původně nepatogenních bakterií do dělohy, propukne v decidue mateřská zánětlivá odpověď. Zánětlivé mediátory i bakterie prostupují dále do plodových obalů, amniové tekutiny i do plodu. Buď je plod exponován přímo přes amniovou tekutinu, nebo krevním oběhem placenta – plod. Tyto procesy zásadně ovlivňují porod a plod v jeho dalším vývoji, spouští totiž nadprodukcí řady zánětlivých mediátorů včetně proteinů spojených s kontrakcemi dělohy a přestavbou cervixu (Elovitz a Wang, 2004). Konkrétně četné studie dokazují schopnost prozánětlivých cytokinů stimulovat produkci prostaglandinů (PGs) a tím způsobit kontrakce dělohy, též stimulovat aktivaci matrixové metaloproteinázy (MMP) a spustit programovanou buněčnou smrt (apoptózu). Tyto procesy vedou k zeslabení a posléze protrhnutí plodových obalů a spuštění porodu (Fortunato *et al.*, 2000).

Přesto, že chorioamnionitida je často evidentní, novorozenci nemají pozitivní nález patogenních bakterií v krevním oběhu (Berger *et al.*, 2003). Dvě hypotézy mohou vysvětlit paradox zánětlivého stavu a současné absence bakterií. První hypotéza uvažuje, že patogen spustí imunitní odpověď v matce případně plodu, je kompletně eradikován mateřským imunitním systémem, ale stále přetrvává zánětlivá reakce. Druhá hypotéza počítá s tím, že bakterie může být původně nepatogenní, ale vzhledem k mateřským genetickým a imunitním předpokladům, různým deficitům, zareaguje imunitní systém matky přehnaně a způsobí zánětlivou reakci (Elovitz a Mrinalini, 2004).

4.1. Toll-like receptory

Možná vůbec nejdůležitější objevy posledních let se týkají TLRs a jejich signální funkce. Amniové epiteliální buňky představují první obrannou linii proti bakteriím. Předpokládá se, že TLRs na povrchu epiteliálních buněk jsou zodpovědné za rozpoznání patogenů a následnou odpověď (Gillaux *et al.*, 2011).

Rozpoznávání patogenů imunitním systémem je zajištěno receptory, které rozpoznávají konzervativní molekulární struktury patogenů (PAMPs, Pathogen Associated Molecular Patterns). Dosud je známo (podle živočišného druhu) až 13 TLRs s touto funkcí. Každý TLRs rozpoznává odlišné PAMPs. TLR1, 2, 4, 5, 6 a 10 jsou exprimovány na povrchu buněk, zatímco TLR3, 7, 8 a 9 jsou exprimovány v cytoplasmě, zejména v endozomech (Gillaux *et al.*, 2011). Například TLR4 rozpoznává LPS, TLR3 zase dvouvláknovou RNA (dsRNA, double strand DNA) zatímco TLR2 navazuje peptidoglykany, lipoproteiny a glykolipidy (Takeuchi *et al.*, 1999). Navíc TLR2 rozpoznává komponenty buněčných stěn kvasinek, případně jako heterodimer s TLR6 nebo TLR1 interaguje s mikrobiálními diacyl nebo triacyl-lipopeptidy, TLR5 má za ligand flagelin a TLR9 nemetylovaný CpG motiv běžně přítomný v bakteriálním a virovém genomu, TLR7 a 8 rozpoznává virové složky jako ssRNA, dsRNA je rozpoznávána TLR3 (Gillaux *et al.*, 2011). Zatím nebyl identifikován žádný specifický spouštěč TLR10.

Navázání patogenní molekuly na TLR spouští intracelulární signální kaskádu přes soubor komponent: Toll/IL-1 receptor- doména adaptorového proteinu (Barton a Medzhitov, 2003). Většina TLR signálních drah je sloučena s adaptorovým proteinem MyD88, výsledkem je translokace NF- κ B do jádra a exprese cytokinů přes různé kinázy. Mnoho pozornosti bylo tedy věnováno expresi a funkcím TLRs v děloze. Některé studie ukázaly, že v lidské placentě se exprimují TLRs a reagují na odpovídající PAMPs produkcí prozánětlivých cytokinů (Thaxton *et al.*, 2010). Stimulace TLR4 vedla k produkci cytokinů, zatímco aktivovaný TLR2 spustil apoptózu trofoblastu (Abrahams a Mor, 2005). Kromě toho při porodu i PTB se zvyšuje exprese TLR2 a TLR4 v chorionu a amnionu. Toto nasvědčuje důležité roli plodových obalů v imunitním systému (Kim *et al.*, 2004). V jiné studii se konkrétně prokázala exprese funkčních TLR5, TLR6/2 a TLR4. Aktivace TLR5 a TLR6/2 spouští produkci IL-6 a IL-8 spojenou se spuštěním signální dráhy NF- κ B, s indukcí matrixové metaloproteinázy-9 a s expresí PTGS-2 (Gillaux *et al.*, 2011). Oproti tomu aktivace TLR-4 lipopolysacharidem snižuje životaschopnost epiteliálních buněk a vyvolává apoptózu,

což dokazuje zvýšený poměr Bax/Bcl2 a štěpení kaspázou-3 (Gillaux *et al.*, 2011). Tato data dokazují, že lidské epiteliální amniové buňky exprimují řadu TLRs a odpovídají na cizorodé ligandy spuštěním imunitní odpovědi, která nakonec může zapříčinit předčasný porod.

Na zvířecích modelech se daří zjišťovat role TLRs. Bylo doloženo, že intraamniálně aplikované LPS nespustí PTB v myších s mutací v TLR4, ale způsobí smrt plodu (Elovitz *et al.*, 2003). TLR4 nikoli však TLR2 deficientní myši jsou odolné vůči indukci PTB po intraamniálním podání *Fusobacterium nucleatum* (Liu *et al.*, 2007). Další studie prokázala, že u TLR3 knock-outů nedocházelo k PTB v takové míře jako u wild type myši při expozici vysoké dávce polyinosinové cytidylové kyseliny (poly[I:C]) (Koga *et al.*, 2009). TLR3 signalizace také poukazuje na možný virem zapříčiněný předčasný porod. Při podání syntetického ligandu v 75 % doby gestace, který zvýšil hladinu IFN γ v děloze, nastala indukce PTB u 35 % myši (Ilievski *et al.*, 2007) Vhled do mechanismů TLRs drah byl více rozšířen, díky důkazu, že MyD88 knock-out myš byla téměř beze zbytku rezistentní vůči PTB po podání LPS, zatímco myš divokého typu předčasně porodila (Filipovich *et al.*, 2009).

Další studie na makaku byla provedena a korelovala s předešlými poznatky. Nejprve aplikovali TL4 antagonistu, ten posléze snížil expresi prozánětlivých cytokinů a kontraktilitu dělohy při podání LPS oproti jedincům bez aplikovaného antagonisty (Adams Waldorf *et al.*, 2008). Ačkoliv multifaktoriální povahy, signalizace založená na TLRs se jeví jako slibný cíl úspěšné léčby spolu s potlačením infekce.

4.2. Cytokiny

Tři hlavní cytokiny zodpovědné za akutní zánětlivou odpověď jsou IL-1, IL-6 a TNF- α (Rankin, 2004) Zvýšené hladiny IL-6 a jiných prozánětlivých cytokinů v amniové tekutině jsou ukazatelem možného PTB (Saji *et al.*, 2000). U matky se zřídka projevují symptomy systematického zánětu, tudíž chorioamnionitida často probíhá asymptomaticky a chronicky. Oproti tomu imunitní odpověď plodu může být velmi významná, zahrnující zánět pupeční šnůry a zvýšenou hladinu prozánětlivých cytokinů v séru plodu (Gantert *et al.*, 2010). Syndrom fetální zánětlivé odpovědi (FIRS) se podobá syndromu systémové zánětlivé odpovědi matky. Důkazem jeho rozvoje je detekce IL-6 v pupečnickové krvi (Gomez *et al.*, 1998). Většina studií o PTB se zabývá cytokiny, dále jsou rozvedeny u jednotlivých modelových druhů.

4.3. Matrixové metaloproteinázy

Plodový obal amnion se vyvíjí cytotrofoblastu a je složen ze tří vrstev. Vrstva epitelu je nejbližší plodu, druhá v pořadí je kompaktní vrstva, ta zejména zodpovídá za pevnost obalu a vnější vrstva houbovitého charakteru vyplňuje meziprostor chorionu a amnionu (Gomez *et al.*, 1997). Kompaktní vrstvu tvoří fibronektiny a kolagen typu I, III, V. (Malak *et al.*, 1994; Malak *et al.*, 1993).

Matrixové metaloproteinázy (MMPs, Matrix metalloproteinases) jsou skupina proteolytických enzymů, které potřebují ke své funkci těžké kovy. Každá metaloproteináza má určitou substrátovou specifitu, proto se ve své konečné funkci mohou výrazně lišit, avšak společná základní funkce je přeměna nebo degradace extracelulární matrix (ECM, Extracellular matrix). Zřejmě se podílí na morfogenezi, ovulaci, uhníždění embrya, menstruaci, vchlipování tkání, angiogenezi, hojení ran, invazi buněk (Irwin *et al.*, 1996; Woessner, Jr., 1991).

Kolagenázy	Gelatinázy	Stromelyziny
MMP1	MMP2	MMP3
MMP8	MMP9	MMP7
MMP13		MMP10
		MMP11

Tab. 3: Typy MMPs.

Předpokládá se, že MMP hrají významnou roli právě při ruptuře plodových obalů a cervikální přestavbě. Zvýšená hladina MMP-9, gelatinázy, která degraduje proteiny bazální laminy, byla popsána v placentě, plodových obalech a amniové tekutině u předčasně narozených makaků i narozených v termínu (Cockle *et al.*, 2007). Další typy MMPs a jejich inhibitorů (TIMPs, Tissue inhibitor of metalloproteinases) jsou též produkovány v chorionamnionu a decidue (Vadillo-Ortega *et al.*, 1996; Osmers *et al.*, 1995). Předčasný porod a předčasná ruptura plodových obalů (PROM, Premature rupture of membranes) je spojen se zvýšením exprese MMP9 v myometriu a chorion-decidue (Osmers *et al.*, 1995; Vadillo-Ortega *et al.*, 1996). V další studii potvrdili zvýšené koncentrace MMP9 a TIMP1 v amniové tekutině u pacientů s PROM a porodem v termínu (Vadillo-Ortega *et al.*, 1996). Porod je spojen též se zvýšenou aktivací MMP kolagenázy typu IV, bez ohledu na osídlení amniové dutiny bakteriemi provází porod zvýšená aktivita 72-kDa kolagenázy, zatímco 92-kDa kolagenáza je významně aktivnější pouze za přítomnosti mikroorganismů v amniové tekutině (Romero *et al.*, 1992).

Bylo zjištěno, že celá řada indukčních faktorů, včetně cytokinů, prostaglandinů a reaktivních forem kyslíku, může vyvolat transkripci MMPs (Kemp *et al.*, 2010). Především zánětlivé cytokiny IL-1 a TNF- α hrají regulační roli spolu s růstovými faktory TGF β a EGF v dostupnosti MMPs a TIMPs (Woessner, Jr., 1991).

Existují i další enzymy podílející se na degradaci extracelulární matrix. Patří sem leukocytární elastáza, serinová proteáza schopná štěpit široké spektrum ECM, regulovaná sekrečním leukocytárním inhibítozem (Gomez *et al.*, 1997). Cervikální mucus obsahoval enzym i jeho inhibitor u pacientů s PROM. Má se totiž za to, že se také účastní ruptury membrán (Helmig *et al.*, 1995). Pozoruhodný nále z byl proveden při pokusu, kde se zjistila zvýšená produkce leukocytární elastázy v amniové tekutině bez současného zvýšení jejího inhibitoru při mikrobiální intraamniální invazi (Romero *et al.*, 1994). To nasvědčuje, že při intraamniální infekci je posílená proteázová aktivita, protože inhibitor nepůsobí v dostatečné koncentraci, aby štěpení zabránil.

Bezpochyby MMPs a TIMPs a patrně i další enzymy zastávají důležité funkce, coby činitelé při porodu a ruptuře membrán. Je nezbytné prozkoumat další potenciální účast rozmanitých typů těchto enzymů při porodu.

Aby se dosáhlo žádoucích pokroků, musí být také porozuměno mechanismům, které způsobují expresi prozánětlivých cytokinů. V této oblasti může být myš velmi přínosný a finančně dostupný model, zejména díky genetickým mutantám.

4.4. Multiorgánová poškození

Již mnoho studií prokázalo spojitost mezi chorioamnionitidou a důsledky pro novorozence. Nejde pouze o akutní onemocnění, ale často také o dlouhodobé. Souhrnně jsou následky označovány jako multiorgánová poškození (MOF, multiorgan failure). Mezi dlouhodobé následky se řadí různé kardiovaskulární deficity, zrakové, sluchové, motorické, neurologické a respirační poruchy (Gantert *et al.*, 2010). Konkrétně např. bronchopulmonární dysplazie (BPD), syndrom dechové tísně (RDS, respiratory distress syndrom) nebo intraventrikulární krvácení, periventrikulární leukomalacie a mozkové obrna (Dammann a Leviton, 1997; Vayrynen *et al.*, 2002). To vše omezuje plnohodnotnost a délku života.

Imunitní odpověď plodu se označuje jako syndrom fetální zánětlivé odpovědi (FIRS) (Gotsch *et al.*, 2007). Velmi byla zjevná byla poškození u novorozenců s příznaky FIRS. Přestože dříve se studie soustředily převážně na respirační a neurologické důsledky, v posledních letech se ukazuje vliv chorioamnionitidy na vývoj dalších orgánů. Tudíž chorioamnionitidu můžeme považovat za příčinu multiorgánového onemocnění, jehož důsledky jsou potenciálně dlouhodobé, a proto je třeba hledat možnosti léčby či prevence již

v raném stádiu. Použitím současných modelů PTB k výzkumu mechanismů, jakými zánět poškozuje plod, může pomoci nalézt efektivní preventivní opatření proti narušenému vývoji orgánů plodu. V této sféře výzkumu jsou modelové organizmy opět nezastupitelné pro pochopení vlivu zánětu a následnému snížení patologických změn při vývoji plodu.

Chorioamnionitida se překvapivě pojí s nižší mírou novorozeneckou úmrtností velmi předčasně narozených jedinců (Gantert *et al.*, 2010). V jedné studii se autoři přiklání k hypotéze, že to nejsou přímo mikroorganismy, kdo působí fetální zánětlivou odpověď a případné poškození tkání, ale mateřská zánětlivá odpověď (Dammann a Leviton, 1997),

což souvisí s otázkou, zdali samotné mikroorganismy pronikají do amniotické dutiny ve většině případů.

Při studiu narušení vývoje mozku byl LPS systémově aplikován potkanovi, ukázalo se, že infekce ovlivní potomka – zvýšily se hladiny cytokinů a došlo k poškození bílé mozkové hmoty (Eklind *et al.*, 2001). Avšak dvě nevýhody provázejí tento model. Jednak ne vždy je systémovou aplikací spuštěn PTB, který sám může významně ovlivnit vývoj jednotlivých orgánů a druhým problémem je, že systémová aplikace LPS může způsobit nízký krevní tlak u mnoha zvířat, což ovlivňuje prokrvení placenty a tím i vývoj mozku plodu. Dochází tedy k odklonu od původního cíle, sice se simuluje porušení mozku nikoli však jen lokálním zánětem, ale i hypoxií. Navíc pokusy týkající se neurologického vývoje na hlodavcích jsou omezeny nepříliš velkou podobností vývoji mozku lidského plodu.

Na ovčím modelu byly pozorovány důsledky pro fetální mozek způsobené intraamniálním podáním LPS (Gavilanes *et al.*, 2009). Ukázalo se, že velmi záleží na době gestace, kdy bylo LPS podáno, protože se podle toho měnil charakter patologických jevů. Došlo k celkovému narušení homeostázy centrálního nervového systému. Objevila se apoptóza, aktivace mikroglie, astroglie a lokálně specifické narušení oligodendrocytů (Gavilanes *et al.*, 2009). Aktivované mikroglie jsou ústředním činitelem při vzniku poškození bílé mozkové hmoty (WMD, white matter disease). Infekce nebo zánětlivá odpověď narušuje myelinizaci a dává vznik lézí v CNS. Za zmínku stojí zajímavá schopnost TNF- α stimulovat strukturální opravy mozku přes astroglialní mozkový neurotrofický faktor (Gantert *et al.*, 2010).

Chorioamnionitida prokazatelně ovlivňuje vývoj plic, jenom výsledky často neodpovídají předpokladům a jejich rozporuplnost neumožňuje vyvodit všeobecné závěry. V každém případě však lze pozorovat souvislost s BPD a RDS (Kramer *et al.*, 2009; Watterberg *et al.*, 1996). Prenatální zánětlivá reakce v plicích způsobuje větší náchylnost k druhotnému onemocnění. Byl ale pozorován i pozitivní efekt zánětlivé odpovědi na vývoj

plic (Bry *et al.*, 1997). Po intraamniální aplikaci LPS se u ovce indikátory zánětu objevily po pěti hodinách společně s přesunem neutrofilů do dýchacích cest, což předcházelo složitým strukturním změnám v plicích, které nakonec vedou k jejich maturaci, ačkoliv nedokonalé (Willet *et al.*, 2000; Kramer *et al.*, 2002). Plíce a mozek nejsou jediné orgány, u kterých byl dokumentován narušený vývoj jako důsledek chorioamnionitidy. V budoucnu možná přibudou poznatky o narušení vývoje dalších orgánů jako je oko, štítná žláza, thymus, střevo, kardiovaskulární systém a kůže (Gantert *et al.*, 2010).

5. STUDIE NA ZVÍŘECÍCH MODELECH

5.1. Myš

Experimenty s běžnou a s geneticky modifikovanou myší pomáhají objasnit roli cytokinů a zánětlivé odpovědi v procesu PTB. Intraperitoneální aplikací lipopolysacharidu (LPS), komponenty buněčné stěny gram-negativních bakterií, se aktivuje Toll-like receptor 4 (TLR4). Ten spouští prozánětlivou odpověď, která u myši způsobí PTB (Fidel, Jr. *et al.*, 1998). Tato systémová imunitní aktivace podobná sepsi vede k poklesu progesteronu a indukci děložních kontrakcí. Tím se myší model vzdaluje od situace lidského předčasného porodu. Nedávno byla prozkoumána metoda intrauterinní aplikace teplem-usmrcené *Escherichia coli* (HKE, Heat killed *Escherichia*), která má napodobit lokální zánět (Hirsch a Muhle, 2002). Za těchto okolností PTB spolehlivě nastává, a ukazuje se, že mechanismy budou odlišné, než je pokles progesteronu, což tento model posouvá směrem k větší srovnatelnosti s člověkem. Na základě této studie byla také potvrzena nezastupitelná úloha TLR4 a jeho adaptorové molekuly MyD88 při HKE-způsobeném PTB (Wang a Hirsch, 2003). Přestože zánětlivé mediátory jsou zapojeny do PTB, farmakologické látky neutralizující vliv IL-1 β (interleukin-1 β) a TNF- α (tumor-necrosis-factor- α) nezabraňují PTB u myši (Fidel, Jr. *et al.*, 1997). Navíc na IL-6 a IL-1 β knock-out myších se prokázalo, že přestože se tyto interleukiny vyskytují ve zvýšeném množství v mateřských i fetálních tkáních během PTB, nejsou nezbytné pro iniciaci PTB (Fidel, Jr. *et al.*, 1997).

Výzkum na speciálně kříženém druhu myši přinesl překvapivé výsledky. Intrauterinně aplikovaná *E. coli* nespustila PTB, zatímco intraamniálně vpravená ano. To napovídá, že u myši může být příčinou PTB lokální zánět (Hirsch *et al.*, 1995). Znamenalo by to, že u různých kmenů myši je PTB různě indukován, tedy lokální i systémová zánětlivá reakce hraje roli a vyžaduje podrobnější prozkoumání.

Další poznatky o zapojení systémové imunity přináší studie výzkumníků, kteří aplikovali vysoké dávky oslabené (atenuované) *E. coli* do podvázaného rohu dělohy březí myši, což vyvolalo expresi IL-1 α , IL-1 β a IL-6. Druhý roh, který nebyl infikován, byl také stimulován k porodním stahům. Toto nasvědčuje, že lokálně produkovaný IL-1 není nezbytný pro spuštění PTB (Hirsch *et al.*, 2002).

Dvojitě knock-outované myši (Il1r1/Tnfrsf1a) prokázaly mnohem nižší incidenci PTB i při vysokých intraamniálních dávkách HKE (heat-killed *E. coli*) (Yoder et al., 2003). Všechny tyto poznatky nasvědčují účasti několika signálních drah při infekci způsobeném porodu. A především naznačuje možnou cestu terapeutického zásahu – zacílit na cytokinovou signalizaci, zde konkrétně na IL-1 a TNF- α . Avšak při podání extrémně vysokých dávek infekčního agens byla incidence PTB u knock-outů srovnatelná s kontrolami. To ovšem může vysvětlit šokový stav matky, ale zároveň to může znamenat, že zacílení na cytokinové dráhy je efektivní pouze do určité míry infekční invaze. Proto by pak jako preventivní opatření mělo být zahrnuto i potlačení samotné infekce (Kemp et al., 2010).

Nedávno byly popsány dvě nové dráhy regulující načasování porodu myši. Předčasný nárůst amniové koncentrace surfaktant proteinu A, údajně aktivujícího prozánětlivou kaskádu s makrofágy a fetální vývoj plic, vede k předčasnému narození (Condon *et al.*, 2004). Podobné změny v koncentraci surfaktant proteinu A u člověka nebyly detekovány. Dalším zjištěním bylo, že děložně specifické narušení p53 vyústí v předčasnou senescenci dělohy a tak ke zvýšené frekvenci PTB u myši (Hirota *et al.*, 2010). Zdali mutace v p53 u člověka souvisí se zvýšenou frekvencí PTB, zůstává zatím neobjasněno.

5.2. Ovce

U ovce se nepodařilo podáním LPS nebo i živých bakterií intraamniální cestou indukovat PTB (Moss *et al.*, 2005). Na jednu stranu je to limitace, na druhou stranu však poskytuje pole k prozkoumání mechanismů udržení gestace i při infekci. V dalších pokusech se ale projevil zánět po intraamniální infekci LPS v mateřských i fetálních tkáních přímo v kontaktu s LPS nebo chorion-amnionem. (Kallapur *et al.*, 2001), což je podobné jako u myši. Subchorionová aplikace LPS způsobila výhradně lokální zánět chorion-aminonu a nevedla k zánětlivé reakci plodu (Moss *et al.*, 2003). Intraamniálně podané LPS indukuje zánětlivou odpověď nejprve chorion-amnion s maximální expresí IL-1, IL-6 a TNF- α po pěti hodinách. Po jednom dni se zvýší exprese cytokinů i v plicích plodu (Kramer *et al.*, 2001). *Ureaplasma urealyticum* aplikovaná v rané graviditě vyvolala statisticky významnou expresi mRNA pro IL-1 β ve fetální plíci 6 a 10 týdnů po aplikaci (Moss *et al.*, 2005). Podobné závěry však nebyly pozorovány při akutní infekci 7 nebo 2 dny před porodem (Moss *et al.*, 2009). Tato data nasvědčují, že rod *Ureoplasma* působí v porovnání s LPS mnohem slabší zánětlivou odpověď, která se projeví až po delší době.

5.3. Primáti

U paviána byla prověřena schopnost *Ureaplasma urealyticum* vyvolat zánět v amniové dutině (Yoder *et al.*, 2003). Ve studii provedené na makakovi byla ověřena zvýšená exprese cytokinů, matrixových metaloproteináz a prostaglandinů v souvislosti se zvýšenou aktivitou dělohy po inokulaci buď *Ureoplasma parvum* nebo *Mycoplasma hominis* (Novy *et al.*, 2009). Pozdější studie, která byla provedena na makakovi, prokázala, že zánět v chorio-deciduálním prostoru vede k přestavbě děložního krčku a ruptuře plodových obalů následované PTB (Grigsby *et al.*, 2010). Po intraamniální aplikaci streptokoka skupiny B se také zvýšila kontraktilita dělohy a zvýšily se hladiny cytokinů a prostaglandinů v amniové tekutině (Gravett *et al.*, 1994). Stejně tak aplikace IL-1 β zvýšila aktivitu dělohy a expresi IL-6, IL-8, a TNF- α (Sadowsky *et al.*, 2000). Byla také potvrzena schopnost IL-1 β i TNF- α spustit PTB u makaka (Sadowsky *et al.*, 2006). Tyto objevy naznačují, že potenciální protizánětlivé léčebné postupy, zaměřené třeba na expresi cytokinů, by pravděpodobně musely být zacíleny na více drah. Studium primátů přineslo ještě jedno zajímavé zjištění. Syntéza prostaglandinů prostaglandin H-syntázou-2 je posílena cytokiny IL-1 β a TNF- α a prostaglandiny, jak známo, zvyšují aktivitu dělohy (Sato *et al.*, 2002). Bylo prokázáno zpoždění porodu po aplikaci inhibitoru prostaglandin H-syntázy-2 (Novy *et al.*, 1974; cit. dle Kemp *et al.*, 2010).

5.4. Prase

Prase představuje zajímavý model ke studiu prenatální imunitní odpovědi, který je používán na pracovišti Mikrobiologického ústavu AV ČR v Novém Hrádku. Byla u něho pozorována migrace *E. coli* z amniové tekutiny do fetálních plic, následovaná akutní odpovědí – přesunem tkáňových makrofágů (Splichal *et al.*, 2002). Významné poznatky prasečí model přinesl při zkoumání amnionu jako zdroje cytokinů a chemokinů. Při podání LPS do amniové dutiny se zvýšila exprese TNF- α a IL-8 v amniovém epitelu, ale při systémovém podání zvýšení nenastalo (Trebichavsky *et al.*, 2002). V dalším pokusu bylo porovnáváno působení nepatogenního a enteropatogenního kmene *E. coli*. Ukázalo se, že míra produkce cytokinů souvisí s virulencí vpravených bakterií. Zatímco patogenní kmen vyvolal silně zvýšenou produkci TNF- α , nepatogenní kmen vyvolal produkci IL-10 (Splichalova *et al.*, 2004). Podobně jako tomu bylo s TNF- α , vzrostla hladina IL-18 v amniové tekutině po infekci enteropatogenní *E. coli*., navíc se objevilo poškození amniového epitelu, což může mít

souvislost s rupturou plodových obalů (Splichalova *et al.*, 2005). U prasete se tedy jeví podobně jako u člověka významná role IL-18 při intraamniální infekci (Menon *et al.*, 2001).

Amnion se vskutku podílí na přirozené imunitní odpovědi produkcí různých mediátorů, čímž vykonává ochrannou funkci, ale zároveň jeho působení může negativně ovlivnit průběh těhotenství a plod, neboť nese odpovědnost za produkci cytokinů a spuštění mechanismů vedoucích k PTB (Keelan *et al.*, 2000).

6. ZÁVĚR

Přes zlepšující se péči dochází ke zvyšování podílu předčasných porodů (PTB, preterm birth), tj. porodů před dokončeným 37. týdnem gestace. U mnoha PTB však zůstává příčina neobjasněna. Intrauterinní infekce jsou jednou z příčin, které ovlivňují normální načasování porodu spuštěním mechanismů PTB a jsou spojeny se zvýšenou nemocností a úmrtností novorozenců. Jestliže pokusy o zásahy proti předčasnému PTB mají být úspěšné, nezbyvá než pochopit signální dráhy aktivované v děloze, děložním krčku, placentě a plodu, které jsou odpovědí na zánět nebo infekci. Je zřejmé, že při případném terapeutickém ovlivnění PTB se nebude jednat o jednoduchou intervenci jednoho mediátoru, bude to muset být složitý zásah, jak se ukazuje například u myši, kde nestačí potlačit působení jenom dvou nebo třech prozánětlivých mediátorů jako např. IL-6, IL-1 β a TNF- α .

Plodové obaly jsou tradičně považovány za tkáň významnou pro průběh a dokončení těhotenství. Amnion se vytváří u lidského embrya 8 dní po oplodnění, nejvnitřnější vrstva, amniový epitel, je v přímém kontaktu s plodovou vodou a zastává ochrannou funkci plodu. V posledních letech se věnuje velká pozornost podílu TLRs na spuštění předčasných porodů. Právě porozumění funkcím TLRs epiteliálních buněk amnionu by mohlo pomoci objasnit složité děje přirozené imunity při intrauterinní infekci.

Na lidech nelze experimentální výzkum provádět z etických důvodů, proto se přistupuje k použití zvířecích modelů. Není sice možné nasimulovat totožnou situaci, přesto jsou zvířecí modely intrauterinních infekcí přínosné při studiu mechanismů iniciace porodu a jejich ovlivnění infekcí nebo zánětem. Usnadňují testování rozmanitých léčebných postupů, které by eliminovaly novorozeneckou úmrtnost. Důležité je porozumění výhodám a nevýhodám daného modelu a potom správné vztahování výsledků k člověku. Určující je cíl bádání, podle něj je volen adekvátní model. Testování potenciálních preventivních zásahů proti PTB vyžaduje větší počet jedinců, proto vyhovují hlodavci. Pokud je cílem pochopení dopadu lokalizovaného intrauterinního zánětu na fetální hemodynamiku, bude vhodným modelem primát nebo ovce.

Podobná reprodukční biologie primátů, imunitní odpověď na lokální infekci a fetální charakteristiky jej předurčují jako významný model lidských intraamniových infekcí. Zásadní problém ale spočívá v nedostupnosti většího počtu zvířat a vysokých nákladech kladoucích nepřekonatelnou překážku pro většinu pracovišť. Navíc z již zmíněného etického hlediska je tento model poměrně kontroverzní. Myši mají kupodivu podobnou reprodukční biologii jako člověk. Navíc je jejich imunitní odpověď podobná lidské, pro výzkum může být použit větší

počet jedinců a k dispozici jsou geneticky modifikované myši. Spolu s nízkými náklady na chov je činí dostupnými. Jinou otázkou však je velikost myších embryí a plodů, kladoucí specifické nároky na manipulaci a operační techniky. Zajímavým modelem se postupně s přibývajícím znalostmi stává prase, které je velikostně srovnatelné s primáty a z etického hlediska přijatelnější.

Diagnostika se stále více přesouvá na molekulární úroveň. Přesto zůstávají nezodpovězeny klíčové otázky, jakou mírou se podílí mateřská a fetální zánětlivá odpověď, dále lokální nebo systémová odpověď, jaký vliv mají různé druhy invadujících patogenů v různých obdobích gestace. Je proto nutné zaměřit se na systémový i lokalizovaný zánět, na imunitní odpověď matky i plodu a možná přizpůsobit léčbu na více mikroorganismů. Jako nejčastější příčiny intrauterinních zánětů a PTB jsou bakterie rodu *Ureaplasma* detekovány častěji než *E. coli*, proto by modely intraamniálních infekcí více odpovídaly skutečnosti za použití těchto bakterií než často aplikovaného lipopolysacharidu (LPS, složka buněčné stěny *E. coli*).

V současnosti je zatím jen těžko představitelné, že složité vztahy vznikající při interakcích matka-plod-infekční agens bude možné studovat za použití *in vitro* nebo *in silico* modelů. Vhodně volené zvířecí modely, infekční agens a nové diagnostické metody budou mít své opodstatnění i v budoucnu a mohou přinést nové poznatky využitelné pro prevenci předčasných porodů způsobených intrauterinními infekcemi.

7. POUŽITÁ LITERATURA

Abrahams,V.M. and Mor,G. (2005) *Toll-like receptors and their role in the trophoblast*. Placenta, 26, 540-547.

Adams Waldorf,K.M., Persing,D., Novy,M.J., Sadowsky,D.W. and Gravett,M.G. (2008) *Pretreatment with toll-like receptor 4 antagonist inhibits lipopolysaccharide-induced preterm uterine contractility, cytokines, and prostaglandins in rhesus monkeys*. Reprod. Sci., 15, 121-127.

Ahman,E., Zupan,J., World Health Organization and Dept.of Making Pregnancy Safer (2007) *Neonatal and perinatal mortalitycountry, regional and global estimates*. World Health Organization, Geneva.

Barton,G.M. and Medzhitov,R. (2003) *Toll-like receptor signaling pathways*. Science, 300, 1524-1525.

Baud,O., Emilie,D., Pelletier,E., Lacaze-Masmonteil,T., Zupan,V., Fernandez,H., Dehan,M., Frydman,R. and Ville,Y. (1999) *Amniotic fluid concentrations of interleukin-1beta, interleukin-6 and TNF-alpha in chorioamnionitis before 32 weeks of gestation: histological associations and neonatal outcome*. Br. J. Obstet. Gynaecol., 106, 72-77.

Beer,A.E. and Billingham,R.E. (1980) *Mechanisms of non-rejection of foeto-placental allografts*. Folia Biol. (Praha), 26, 225-243.

Berger,A., Witt,A., Haiden,N., Kretzer,V., Heinze,G. and Kohlhauser,C. (2003) *Microbial invasion of the amniotic cavity at birth is associated with adverse short-term outcome of preterm infants*. J. Perinat. Med., 31, 115-121.

Bittencourt,A.L. and Garcia,A.G. (2002) *The placenta in hematogenous infections*. Pediatr. Pathol. Mol. Med., 21, 401-432.

Bry,K., Lappalainen,U. and Hallman,M. (1997) *Intraamniotic interleukin-1 accelerates surfactant protein synthesis in fetal rabbits and improves lung stability after premature birth*. J. Clin. Invest, 99, 2992-2999.

Challis,J.R.G., Matthews,S.G., Gibb,W. and Lye,S.J. (2000) *Endocrine and paracrine regulation of birth at term and preterm*. Endocr. Rev., 21, 514-550.

Chucri,T.M., Monteiro,J.M., Lima,A.R., Salvadori,M.L., Kfoury,J.R., Jr. and Miglino,M.A. (2010) *A review of immune transfer by the placenta*. J. Reprod. Immunol., 87, 14-20.

Cockle,J.V., Gopichandran,N., Walker,J.J., Levene,M.I. and Orsi,N.M. (2007) *Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in preterm perinatal complications*. Reprod. Sci., 14, 629-645.

Condon,J.C., Jeyasuria,P., Faust,J.M. and Mendelson,C.R. (2004) *Surfactant protein secreted by the maturing mouse fetal lung acts as a hormone that signals the initiation of parturition*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 101, 4978-4983.

da Fonseca,E.B., Bittar,R.E., Carvalho,M.H. and Zugaib,M. (2003) *Prophylactic administration of progesterone by vaginal suppository to reduce the incidence of spontaneous preterm birth in women at increased risk: a randomized placebo-controlled double-blind study*. Am. J. Obstet. Gynecol., 188, 419-424.

Dammann,O. and Leviton,A. (1997) *Maternal intrauterine infection, cytokines, and brain damage in the preterm newborn*. Pediatr. Res., 42, 1-8.

Eklind,S., Mallard,C., Leverin,A.L., Gilland,E., Blomgren,K., Mattsby-Baltzer,I. and Hagberg,H. (2001) *Bacterial endotoxin sensitizes the immature brain to hypoxic--ischaemic injury*. Eur. J. Neurosci., 13, 1101-1106.

Elovitz,M. and Wang,Z. (2004) *Medroxyprogesterone acetate, but not progesterone, protects against inflammation-induced parturition and intrauterine fetal demise*. Am. J. Obstet. Gynecol., 190, 693-701.

- Elovitz,M.A. and Mrinalini,C.** (2004) *Animal models of preterm birth*. Trends Endocrinol. Metab, 15, 479-487.
- Elovitz,M.A., Wang,Z., Chien,E.K., Rychlik,D.F. and Phillippe,M.** (2003) *A new model for inflammation-induced preterm birth: the role of platelet-activating factor and Toll-like receptor-4*. Am. J. Pathol., 163, 2103-2111.
- Ernest,J.M. and Wasilaukas,B.** (1985) *Capnocytophaga in the amniotic fluid of a woman in preterm labor with intact membranes*. Am. J. Obstet. Gynecol., 153, 648-649.
- Fidel,P.I., Jr., Romero,R., Maymon,E. and Hertelendy,F.** (1998) *Bacteria-induced or bacterial product-induced preterm parturition in mice and rabbits is preceded by a significant fall in serum progesterone concentrations*. J. Matern. Fetal Med., 7, 222-226.
- Fidel,P.L., Jr., Romero,R., Cutright,J., Wolf,N., Gomez,R., Araneda,H., Ramirez,M. and Yoon,B.H.** (1997) *Treatment with the interleukin-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor Fc fusion protein does not prevent endotoxin-induced preterm parturition in mice*. J. Soc. Gynecol. Investig., 4, 22-26.
- Filipovich,Y., Lu,S.J., Akira,S. and Hirsch,E.** (2009) *The adaptor protein MyD88 is essential for E coli-induced preterm delivery in mice*. Am. J. Obstet. Gynecol., 200, 93-98.
- Fortunato,S.J., Menon,R., Bryant,C. and Lombardi,S.J.** (2000) *Programmed cell death (apoptosis) as a possible pathway to metalloproteinase activation and fetal membrane degradation in premature rupture of membranes*. Am. J. Obstet. Gynecol., 182, 1468-1476.
- Gantert,M., Been,J.V., Gavilanes,A.W., Garnier,Y., Zimmermann,L.J. and Kramer,B.W.** (2010) *Chorioamnionitis: a multiorgan disease of the fetus?* J. Perinatol., 30 Suppl, S21-S30.
- Gardella,C., Hitti,J., Martin,T.R., Ruzinski,J.T. and Eschenbach,D.** (2001) *Amniotic fluid lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 as mediators of the inflammatory response in preterm labor*. Am. J. Obstet. Gynecol., 184, 1241-1248.
- Gavilanes,A.W., Strackx,E., Kramer,B.W., Gantert,M., Van den Hove,D., Steinbusch,H., Garnier,Y., Cornips,E., Steinbusch,H., Zimmermann,L. and Vles,J.** (2009) *Chorioamnionitis induced by intraamniotic lipopolysaccharide resulted in an interval-dependent increase in central nervous system injury in the fetal sheep*. Am. J. Obstet. Gynecol., 200, 437-438.
- Gillaux,C., Mehats,C., Vaiman,D., Cabrol,D. and Breuiller-Fouche,M.** (2011) *Functional screening of TLRs in human amniotic epithelial cells*. J. Immunol., 187, 2766-2774.
- Goldenberg,R.L., Culhane,J.F., Iams,J.D. and Romero,R.** (2008) *Epidemiology and causes of preterm birth*. Lancet, 371, 75-84.
- Goldenberg,R.L., Hauth,J.C. and Andrews,W.W.** (2000) *Intrauterine infection and preterm delivery*. N. Engl. J. Med., 342, 1500-1507.
- Gomez,R., Romero,R., Edwin,S.S. and David,C.** (1997) *Pathogenesis of preterm labor and preterm premature rupture of membranes associated with intraamniotic infection*. Infect. Dis. Clin. North Am., 11, 135-176.
- Gomez,R., Romero,R., Ghezzi,F., Yoon,B.H., Mazor,M. and Berry,S.M.** (1998) *The fetal inflammatory response syndrome*. Am. J. Obstet. Gynecol., 179, 194-202.
- Gotsch,F., Romero,R., Kusanovic,J.P., Mazaki-Tovi,S., Pineles,B.L., Erez,O., Espinoza,J. and Hassan,S.S.** (2007) *The fetal inflammatory response syndrome*. Clin. Obstet. Gynecol., 50, 652-683.
- Gravett,M.G., Witkin,S.S., Haluska,G.J., Edwards,J.L., Cook,M.J. and Novy,M.J.** (1994) *An experimental model for intraamniotic infection and preterm labor in rhesus monkeys*. Am. J. Obstet. Gynecol., 171, 1660-1667.
- Grigsby,P.L., Hirst,J.J., Scheerlinck,J.P., Phillips,D.J. and Jenkin,G.** (2003) *Fetal responses to maternal and intra-amniotic lipopolysaccharide administration in sheep*. Biol. Reprod., 68, 1695-1702.
- Grigsby,P.L., Novy,M.J., Adams Waldorf,K.M., Sadowsky,D.W. and Gravett,M.G.** (2010) *Choriodecidual inflammation: a harbinger of the preterm labor syndrome*. Reprod. Sci., 17, 85-94.

- Gyetzvai,K., Hannah,M.E., Hodnett,E.D. and Ohlsson,A.** (1999) *Tocolytics for preterm labor: a systematic review*. *Obstet. Gynecol.*, 94, 869-877.
- Helmig,R., Ulbjerg,N. and Ohlsson,K.** (1995) *Secretory leukocyte protease inhibitor in the cervical mucus and in the fetal membranes*. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 59, 95-101.
- Heron,M., Sutton,P.D., Xu,J., Ventura,S.J., Strobino,D.M. and Guyer,B.** (2010) *Annual summary of vital statistics: 2007*. *Pediatrics*, 125, 4-15.
- Hirota,Y., Daikoku,T., Tranguch,S., Xie,H., Bradshaw,H.B. and Dey,S.K.** (2010) *Uterine-specific p53 deficiency confers premature uterine senescence and promotes preterm birth in mice*. *J. Clin. Invest.*, 120, 803-815.
- Hirsch,E. and Muhle,R.** (2002) *Intrauterine bacterial inoculation induces labor in the mouse by mechanisms other than progesterone withdrawal*. *Biol. Reprod.*, 67, 1337-1341.
- Hirsch,E., Muhle,R.A., Mussalli,G.M. and Blanchard,R.** (2002) *Bacterially induced preterm labor in the mouse does not require maternal interleukin-1 signaling*. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 186, 523-530.
- Hirsch,E., Saotome,I. and Hirsh,D.** (1995) *A model of intrauterine infection and preterm delivery in mice*. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 172, 1598-1603.
- Ibrahim,Z., Busch,J., Awwad,M., Wagner,R., Wells,K. and Cooper,D.K.** (2006) *Selected physiologic compatibilities and incompatibilities between human and porcine organ systems*. *Xenotransplantation.*, 13, 488-499.
- Ilievski,V., Lu,S.J. and Hirsch,E.** (2007) *Activation of toll-like receptors 2 or 3 and preterm delivery in the mouse*. *Reprod. Sci.*, 14, 315-320.
- Irwin,J.C., Kirk,D., Gwatkin,R.B., Navre,M., Cannon,P. and Giudice,L.C.** (1996) *Human endometrial matrix metalloproteinase-2, a putative menstrual proteinase. Hormonal regulation in cultured stromal cells and messenger RNA expression during the menstrual cycle*. *J. Clin. Invest.*, 97, 438-447.
- Kallapur,S.G., Willet,K.E., Jobe,A.H., Ikegami,M. and Bachurski,C.J.** (2001) *Intra-amniotic endotoxin: chorioamnionitis precedes lung maturation in preterm lambs*. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.*, 280, L527-L536.
- Karteris,E., Zervou,S., Pang,Y., Dong,J., Hillhouse,E.W., Randeve,H.S. and Thomas,P.** (2006) *Progesterone signaling in human myometrium through two novel membrane G protein-coupled receptors: potential role in functional progesterone withdrawal at term*. *Mol. Endocrinol.*, 20, 1519-1534.
- Keelan,J.A., Sato,T.A., Gupta,D.K., Marvin,K.W. and Mitchell,M.D.** (2000) *Prostanoid stimulation of cytokine production in an amnion-derived cell line: evidence of a feed-forward mechanism with implications for term and preterm labor*. *J. Soc. Gynecol. Investig.*, 7, 37-44.
- Kemp,M.W., Saito,M., Newnham,J.P., Nitsos,I., Okamura,K. and Kallapur,S.G.** (2010) *Preterm birth, infection, and inflammation advances from the study of animal models*. *Reprod. Sci.*, 17, 619-628.
- Kim,Y.M., Romero,R., Chaiworapongsa,T., Kim,G.J., Kim,M.R., Kuivaniemi,H., Tromp,G., Espinoza,J., Bujold,E., Abrahams,V.M. and Mor,G.** (2004) *Toll-like receptor-2 and -4 in the chorioamniotic membranes in spontaneous labor at term and in preterm parturition that are associated with chorioamnionitis*. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 191, 1346-1355.
- Kimura,T., Ogita,K., Kusui,C., Ohashi,K., Azuma,C. and Murata,Y.** (1999) *What knockout mice can tell us about parturition*. *Rev. Reprod.*, 4, 73-80.
- Koga,K., Cardenas,I., Aldo,P., Abrahams,V.M., Peng,B., Fill,S., Romero,R. and Mor,G.** (2009) *Activation of TLR3 in the trophoblast is associated with preterm delivery*. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 61, 196-212.

- Kohmura,Y., Kirikae,T., Kirikae,F., Nakano,M. and Sato,I.** (2000) *Lipopolysaccharide (LPS)-induced intra-uterine fetal death (IUFD) in mice is principally due to maternal cause but not fetal sensitivity to LPS.* Microbiol. Immunol., 44, 897-904.
- Kramer,B.W., Kallapur,S., Newnham,J. and Jobe,A.H.** (2009) *Prenatal inflammation and lung development.* Semin. Fetal Neonatal Med., 14, 2-7.
- Kramer,B.W., Kramer,S., Ikegami,M. and Jobe,A.H.** (2002) *Injury, inflammation, and remodeling in fetal sheep lung after intra-amniotic endotoxin.* Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol, 283, L452-L459.
- Kramer,B.W., Moss,T.J., Willet,K.E., Newnham,J.P., Sly,P.D., Kallapur,S.G., Ikegami,M. and Jobe,A.H.** (2001) *Dose and time response after intraamniotic endotoxin in preterm lambs.* Am. J. Respir. Crit Care Med., 164, 982-988.
- Lahra,M.M., Beeby,P.J. and Jeffery,H.E.** (2009) *Intrauterine inflammation, neonatal sepsis, and chronic lung disease: a 13-year hospital cohort study.* Pediatrics, 123, 1314-1319.
- Landor,M.** (1995) *Maternal-fetal transfer of immunoglobulins.* Ann. Allergy Asthma Immunol., 74, 279-283.
- Liu,H., Redline,R.W. and Han,Y.W.** (2007) *Fusobacterium nucleatum induces fetal death in mice via stimulation of TLR4-mediated placental inflammatory response.* J. Immunol., 179, 2501-2508.
- Malak,T.M., Mulholland,G. and Bell,S.C.** (1994) *Morphometric characteristics of the decidua, cytotrophoblast, and connective tissue of the prelabor ruptured fetal membranes.* Ann. N. Y. Acad. Sci., 734, 430-432.
- Malak,T.M., Ockleford,C.D., Bell,S.C., Dalgleish,R., Bright,N. and Macvicar,J.** (1993) *Confocal immunofluorescence localization of collagen types I, III, IV, V and VI and their ultrastructural organization in term human fetal membranes.* Placenta, 14, 385-406.
- Markenson,G.R., Martin,R.K., Tillotson-Criss,M., Foley,K.S., Stewart,R.S., Jr. and Yancey,M.** (1997) *The use of the polymerase chain reaction to detect bacteria in amniotic fluid in pregnancies complicated by preterm labor.* Am. J. Obstet. Gynecol., 177, 1471-1477.
- Menon,R., Lombardi,S.J. and Fortunato,S.J.** (2001) *IL-18, a product of choriodecidual cells, increases during premature rupture of membranes but fails to turn on the Fas-FasL-mediated apoptosis pathway.* J. Assist. Reprod. Genet., 18, 276-284.
- Mesiano,S., Chan,E.C., Fitter,J.T., Kwek,K., Yeo,G. and Smith,R.** (2002) *Progesterone withdrawal and estrogen activation in human parturition are coordinated by progesterone receptor A expression in the myometrium.* J. Clin. Endocrinol. Metab, 87, 2924-2930.
- Meurens,F., Summerfield,A., Nauwynck,H., Saif,L. and Gerdtts,V.** (2012) *The pig: a model for human infectious diseases.* Trends Microbiol., 20, 50-57.
- Mitchell,B.F. and Taggart,M.J.** (2009) *Are animal models relevant to key aspects of human parturition?* Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol, 297, R525-R545.
- Moffett,A. and Loke,C.** (2006) *Immunology of placentation in eutherian mammals.* Nat. Rev. Immunol., 6, 584-594.
- Moss,T.J., Nitsos,I., Ikegami,M., Jobe,A.H. and Newnham,J.P.** (2005) *Experimental intrauterine Ureaplasma infection in sheep.* Am. J. Obstet. Gynecol., 192, 1179-1186.
- Moss,T.J., Nitsos,I., Knox,C.L., Polglase,G.R., Kallapur,S.G., Ikegami,M., Jobe,A.H. and Newnham,J.P.** (2009) *Ureaplasma colonization of amniotic fluid and efficacy of antenatal corticosteroids for preterm lung maturation in sheep.* Am. J. Obstet. Gynecol., 200, 96.
- Moss,T.J., Nitsos,I., Newnham,J.P., Ikegami,M. and Jobe,A.H.** (2003) *Chorioamnionitis induced by subchorionic endotoxin infusion in sheep.* Am. J. Obstet. Gynecol., 189, 1771-1776.
- Muglia,L.J. and Katz,M.** (2010) *The enigma of spontaneous preterm birth.* N. Engl. J. Med., 362, 529-535.
- Novy,M.J., Cook,M.J. and Manaugh,L.** (1974) *Indomethacin block of normal onset of parturition in primates.* Am. J. Obstet. Gynecol., 118, 412-416.

- Novy,M.J., Duffy,L., Axthelm,M.K., Sadowsky,D.W., Witkin,S.S., Gravett,M.G., Cassell,G.H. and Waites,K.B.** (2009) *Ureaplasma parvum* or *Mycoplasma hominis* as sole pathogens cause chorioamnionitis, preterm delivery, and fetal pneumonia in rhesus macaques. *Reprod. Sci.*, 16, 56-70.
- Osmers,R.G., Blaser,J., Kuhn,W. and Tschesche,H.** (1995) *Interleukin-8 synthesis and the onset of labor*. *Obstet. Gynecol.*, 86, 223-229.
- Pieber,D., Allport,V.C., Hills,F., Johnson,M. and Bennett,P.R.** (2001) *Interactions between progesterone receptor isoforms in myometrial cells in human labour*. *Mol. Hum. Reprod.*, 7, 875-879.
- Rankin,J.A.** (2004) *Biological mediators of acute inflammation*. *AACN. Clin. Issues*, 15, 3-17.
- Ratajczak,C.K., Fay,J.C. and Muglia,L.J.** (2010) *Preventing preterm birth: the past limitations and new potential of animal models*. *Dis. Model. Mech.*, 3, 407-414.
- Reznikov,L.L., Fantuzzi,G., Selzman,C.H., Shames,B.D., Barton,H.A., Bell,H., McGregor,J.A. and Dinarello,C.A.** (1999) *Utilization of endoscopic inoculation in a mouse model of intrauterine infection-induced preterm birth: role of interleukin 1beta*. *Biol. Reprod.*, 60, 1231-1238.
- Romero,R., Gomez,R. and Helming,R.** (1994) *Amniotic fluid elastase and secretory leukocyte protease natural inhibitor during labor, rupture of membranes, and intrauterine infection*. Presentation at the Annual Meeting of the Society for Gynecologic Investigation. Chicago, March 22-26.
- Romero,R., Mazor,M. and Tartakovsky,B.** (1991) *Systemic administration of interleukin-1 induces preterm parturition in mice*. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 165, 969-971.
- Romero,R., Ray,J. and Sepulveda,W.** (1992) *Evidence of active forms of 72 kDa and 92 kDa type IV collagenases in human parturition*. Presented at the 39th annual meeting of the Society for Gynecologic Investigation. San Antonio, March 18-21.
- Sadowsky,D.W., Adams,K.M., Gravett,M.G., Witkin,S.S. and Novy,M.J.** (2006) *Preterm labor is induced by intraamniotic infusions of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha but not by interleukin-6 or interleukin-8 in a nonhuman primate model*. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 195, 1578-1589.
- Sadowsky,D.W., Haluska,G.J., Gravett,M.G., Witkin,S.S. and Novy,M.J.** (2000) *Indomethacin blocks interleukin 1beta-induced myometrial contractions in pregnant rhesus monkeys*. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 183, 173-180.
- Saji,F., Samejima,Y., Kamiura,S. and Koyama,M.** (1999) *Dynamics of immunoglobulins at the fetomaternal interface*. *Rev. Reprod.*, 4, 81-89.
- Saji,F., Samejima,Y., Kamiura,S., Sawai,K., Shimoya,K. and Kimura,T.** (2000) *Cytokine production in chorioamnionitis*. *J. Reprod. Immunol.*, 47, 185-196.
- Sato,T.A., Keelan,J.A. and Mitchell,M.D.** (2002) *Regulation of prostaglandin production in an immortalized human myometrial cell line by cytokines and non-steroidal anti-inflammatory drugs*. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 100, 158-162.
- Splichal,I., Trebichavsky,I., Splichalova,A., Ditetova,L. and Zahradnickova,M.** (2002) *Escherichia coli administered into pig amniotic cavity appear in fetal airways and attract macrophages into fetal lungs*. *Physiol Res.*, 51, 523-528.
- Splichalova,A., Splichal,I., Trebichavsky,I. and Hojna,H.** (2004) *Expression of inflammatory markers in pig amnion after intraamniotic infection with nonpathogenic or enteropathogenic Escherichia coli*. *Folia Microbiol. (Praha)*, 49, 751-756.
- Splichalova,A., Trebichavsky,I., Muneta,Y., Mori,Y. and Splichal,I.** (2005) *Effect of bacterial virulence on IL-18 expression in the amnion infected with Escherichia coli*. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 53, 255-260.
- Šterzl,J.** (1993) *Předání mateřských protilátek plodu a novorozenci*. In Šterzl,J. (ed.), *Imunitní systém a jeho fyziologické funkce*. pp. 355-364.

- Takeuchi,O., Hoshino,K., Kawai,T., Sanjo,H., Takada,H., Ogawa,T., Takeda,K. and Akira,S.** (1999) *Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components.* Immunity., 11, 443-451.
- Terrone,D.A., Rinehart,B.K., Granger,J.P., Barrilleaux,P.S., Martin,J.N., Jr. and Bennett,W.A.** (2001) *Interleukin-10 administration and bacterial endotoxin-induced preterm birth in a rat model.* Obstet. Gynecol., 98, 476-480.
- Thaxton,J.E., Nevers,T.A. and Sharma,S.** (2010) *TLR-mediated preterm birth in response to pathogenic agents.* Infect. Dis. Obstet. Gynecol., 2010.
- Tizard,I.R.** (2009) *Immunity in the fetus and newborn.* Veterinary Immunology: An Introduction, 7th ed. Elsevier, 221-233.
- Tlaskalova-Hogenova,H., Mandel,L., Trebichavsky,I., Kovaru,F., Barot,R. and Sterzl,J.** (1994) *Development of immune responses in early pig ontogeny.* Vet. Immunol. Immunopathol., 43, 135-142.
- Trebichavsky,I., Splichal,I., Zahradnickova,M., Splichalova,A. and Mori,Y.** (2002) *Lipopolysaccharide induces inflammatory cytokines in the pig amnion.* Vet. Immunol. Immunopathol., 87, 11-18.
- Ustun,C., Kocak,I., Baris,S., Uzel,A. and Saltik,F.** (2001) *Subclinical chorioamnionitis as an etiologic factor in preterm deliveries.* Int. J. Gynaecol. Obstet., 72, 109-115.
- Vadillo-Ortega,F., Hernandez,A., Gonzalez-Avila,G., Bermejo,L., Iwata,K. and Strauss,J.F., III** (1996) *Increased matrix metalloproteinase activity and reduced tissue inhibitor of metalloproteinases-1 levels in amniotic fluids from pregnancies complicated by premature rupture of membranes.* Am. J. Obstet. Gynecol., 174, 1371-1376.
- van Engelen,E., de Groot,M.W., Breeveld-Dwarkasing,V.N., Everts,M.E., van der Weyden,G.C., Taverne,M.A. and Rutten,V.P.** (2009) *Cervical ripening and parturition in cows are driven by a cascade of pro-inflammatory cytokines.* Reprod. Domest. Anim, 44, 834-841.
- Vayrynen,O., Glumoff,V. and Hallman,M.** (2002) *Regulation of surfactant proteins by LPS and proinflammatory cytokines in fetal and newborn lung.* Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol, 282, L803-L810.
- Wang,B., Navath,R.S., Menjoge,A.R., Balakrishnan,B., Bellair,R., Dai,H., Romero,R., Kannan,S. and Kannan,R.M.** (2010) *Inhibition of bacterial growth and intramniotic infection in a guinea pig model of chorioamnionitis using PAMAM dendrimers.* Int. J. Pharm., 395, 298-308.
- Wang,H. and Hirsch,E.** (2003) *Bacterially-induced preterm labor and regulation of prostaglandin-metabolizing enzyme expression in mice: the role of toll-like receptor 4.* Biol. Reprod., 69, 1957-1963.
- Watterberg,K.L., Demers,L.M., Scott,S.M. and Murphy,S.** (1996) *Chorioamnionitis and early lung inflammation in infants in whom bronchopulmonary dysplasia develops.* Pediatrics, 97, 210-215.
- Willet,K.E., Jobe,A.H., Ikegami,M., Newnham,J., Brennan,S. and Sly,P.D.** (2000) *Antenatal endotoxin and glucocorticoid effects on lung morphometry in preterm lambs.* Pediatr. Res., 48, 782-788.
- Woessner,J.F., Jr.** (1991) *Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling.* FASEB J., 5, 2145-2154.
- Yoder,B.A., Coalson,J.J., Winter,V.T., Siler-Khodr,T., Duffy,L.B. and Cassell,G.H.** (2003) *Effects of antenatal colonization with ureaplasma urealyticum on pulmonary disease in the immature baboon.* Pediatr. Res., 54, 797-807.
- Yoon,B.H., Romero,R., Moon,J.B., Shim,S.S., Kim,M., Kim,G. and Jun,J.K.** (2001) *Clinical significance of intra-amniotic inflammation in patients with preterm labor and intact membranes.* Am. J. Obstet. Gynecol., 185, 1130-1136.
- Yoon,B.H., Yang,S.H., Jun,J.K., Park,K.H., Kim,C.J. and Romero,R.** (1996) *Maternal blood C-reactive protein, white blood cell count, and temperature in preterm labor: a comparison with amniotic fluid white blood cell count.* Obstet. Gynecol., 87, 231-237.